**CTBによる神経細胞の逆行性標識④**

**(抗体染色＋蛍光標識ストレプトアビジン＋蛍光ニッスル、浮遊法)**

1. 先端径15–25 µmのガラス管にCTB溶液を1 µl程度充填する。

2. 麻酔下動物の脳にガラス電極を刺入し、脳定位的に目的の脳部位に進める。

3. ピコスプリッツァーで10–30 psi, 10–30 ms, 0.1Hzの圧をかけ、0.1–0.5 µl注入する。

4. 動物をリカバリーして、48 hr飼育する。

5. 動物を深麻酔下経心臓的に4%PFA+0.2%PA /PB pH7.2–7.3で灌流固定する。後固定ON。

6. 10–30%スクロースで落とす。

7. クライオモルドにOCTコンパウンドで包埋する（ドライアイス/アセトン）。

8. クライオスタット (-25~18°C) で 20–50 µm厚に薄切する。不凍液中に収穫。

9. PBS wash

以下遮光、室温

10. 10%NRS in PBS-XCR, 30 min on shaker

11. 1st antibody in PBS-XCR, ON on shaker

12. PBS-X wash

13. 2nd antibody in PBS-XCR, 2 hr on shaker

14. PBS-X wash

15. Streptavidin-Alexa633 solution, 2 hr on shaker

16. PBS wash

17. ゼラチンコートスライドガラスにマウントする。

18. 風乾 (30 min)

19. 蛍光ニッスル染色（ブルー）

20. 50% glycerol/2.5% DABCO in PBSで封入。

21. 観察

**溶液**

**CTB溶液**

0.1-1.0% CTB in 50 mM PBS (0.5%)

**蛍光標識ストレプトアビジン反応液**

Streptavidin-Alexa Fluor 633 2.5 µg/ml (1 mg/mlストックを400倍希釈)

Triton-X 100 0.3%

in PBS

**PBS-X** (total 550 ml程度)

30% Triton X-100 5.5 ml final 0.3%

in PBS 544.5 ml

**PBS-XCR** (150 ml程度)

lambda-carrageenan 0.18 g (final 0.12%)

normal rabbit serum 1.5 ml (final 1%)

sodium azide 30 mg (final 0.02%)

in PBS-X 148.5 ml

**10%NRS in PBS-XCR** (5 ml程度)

normal rabbit serum 0.45 ml (final 10%)

in PBS-XCR 4.55ml

**1st antibody** (10,000倍希釈)

Goat anti-CTB (List Biological Lab. Inc. Cat. #703 (フナコシ))

in PBS-XCR

**2nd antibody** (BA-5000, Vector laboratory) (400倍希釈)

biotinylated rabbit anti-goat IgG原液1.5 mg/ml -> final 3.75 µg/ml

in PBS-XCR

**Reagents**

CTB (Sigma C9903), 0.5 mg \29,600

Goat anti-CTB (List Biological Lab. Inc. Cat. #703 (フナコシ)), 0.1 ml \12, 000

Normal rabbit serum (Vector S-5000) 20 ml \14,000