**CTB-biotinによる神経細胞の逆行性標識③**

**(浮遊法, CO染色)**

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 (0.5%GA) in 0.1M PB pH7.4で灌流固定する。後固定ON。

6. 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 (-18°C) で25–50 µm厚に薄切する。不凍液中に収穫。

9. PBS wash

10. CO反応液を準備する

11. CO反応。37°C、1.5–3.0 h (2 h)。または4°C、ON。

12. PBS wash

13. 100%MeOH, 15 min

14. 0.1%H2O2 in 10%MeOH/PBS, 15 min

15. PBS wash

16. 0.75% TritonX-100/PBS, 1hr

17. ABC/Triton/PBS, 2h 振盪

18. PBS wash

19. TBS wash

20. Ni,DAB reaction, Dark, 20-60 min

21. 2% sodium azide PBS wash

22. PBS wash

23. PB wash

24. ゼラチンコートスライドガラスにマウントする。

25. 風乾 (1h)。

26. PB wash

27. dw wash

28. 70-95%EtOH

29. 100%EtOH

30. Xylene

31. EUXITTで封入

**溶液**

**0.5% CTB-biotin溶液**

CTB-biotin (C9972, Sigma) 500 µg in 100 µl PBS

**Cytochrome C反応溶液**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  |  | 1単位 | ml  Cytochrome C ; Sigma C2506  DAB ; Sigma D9015  　又はDojin 343-00901 |
| A液 | DAB | 25 mg | mg |
|  | dw | 25 ml | ml |
| B液 | Cytochrome C | 15 mg | mg |
|  | Sucrose | 2 g | g |
|  | 0.2M PB | 25 ml | ml |

A液、B液を混ぜ合わせて、濾過。

**10% MtOH, 0.1% H2O2 in PBS**（total 50 ml）

MtOH 5 ml

30% H2O2  0.167 ml

0.05M PBS 44.833 ml

**0.75% Triton X-100 in PBS (PBS-X)**（total 50 ml）

30% Triton X-100 1.25 ml

0.05M PBS 48.75 ml

**ABC反応液**（total 12 ml）（使用30 min前に作製）(approx. 1:100)

A液 3滴 (120 µl) VECTASTAIN Elite ABC kit

B液 3滴 (120 µl) VECTASTAIN Elite ABC kit

in PBS-X

**Ni-DAB反応液**（total 50 ml） ＜in Dark＞）

　 DAB 25 mg (final 0.05%)

0.05M TBS 45 ml（RT）

直前 4% Nikel Ammonium Sulfate 5 ml **← 4% NiAS**　NiAS・6H2O 200 mg／5 ml TBS

(final 10 mM (0.4%) NiAS)

直前 0.3% H2O2 　 500 µl（最後に加える）**← 0.3% H2O2 in 0.05M TBS**

0.05M TBS 0.99 ml + 30% H2O2 10 µl

(final 0.003% H2O2)

**2% Sodium Azide溶液**（全量 6 ml）

Sodium Azide 120 mg

0.05M PBS 6 ml