**CTB-biotinによる神経細胞の逆行性標識②**

**(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-biotin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 /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 (-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. PBS-X, 30 min振盪

11. 蛍光標識Streptavidin溶液, 2h振盪

12. PBS wash

13. ゼラチンコートスライドガラスにマウントする。

14. 風乾 (30 min)。

15. 蛍光ニッスル染色（ブルー）

16. 50% glycerol/2.5% DABCO in PBSで封入。

17. 観察

**溶液**

**CTB溶液**

0.1-1.0% CTB-biotin 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

**0.3% Triton X-100 in PBS (PBS-X)**

30% Triton X-100を100倍希釈

**Mounting medium**

250 mg triethylene diamine (DABCO)

5 ml glycerol

5 ml PBS

**Reagents**

Cholera Toxin B subunit biotin conjugate (Sigma): C9972, 0.5 mg, \36,600

Streptavidin-Alexa Fluor 633 (Invitrogen): S21375, 1 mg, \36,750