Cascade Blue - tdTomato - VGluT2 Triple Staining (fixed)

すべて室温、遮光

0. 神経細胞にtdTomatoを導入・発現する

色素の注入 ([Oga *et al.*, 2009](#_ENREF_3))

1. 4%PFA in PB (pH 7.4) で経心臓的に灌流固定する

2. 脱脳し、後固定、ON

3. ビブラトームで250 µm thickの厚さに薄切する

4. 24穴wellプレートに移し、PB wash

5. 1 µg/ml DAPI in PB, 5–15 min

6. スライスをメンブレンフィルタ上に固定する

7. スライスをチャンバーに静置し、0.1 M PBを注ぐ

6. 細胞に電極を刺入し、陰電荷としてcascade blueを注入する (-10–20 nA)

7. 再固定: 4%PFA in PB (pH 7.4), 30 min

8. PBS wash

抗体染色 ([Kawaguchi & Kubota, 1996](#_ENREF_1))

9. 10%Sucrose in PB, 30 min

10. 20%Sucrose in PB, 1 hr

11. Freeze and thaw with dry ice, three times

12. PBS wash

13. 10%NGS in PBS-X, 30 min

14. 1st antibody in PBS-XG, ON (振盪)

15. PBS-X wash

16. 2nd antibody in PBS-XG, 2 hr (振盪)

17. PBS-X wash

18. PBS wash

19. 2% gelatin, 15 min

20. スライドガラスにマウント

21. 50% (v/v) glycerol/2.5% (w/v) triethylene diamine in PBSまたはVECTASHIELD Hard setで封入

22. 観察

Slice: 　　　　　　 　 　　Date:

<切片プレート>

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| A |  |  |  |  |  |  |
| B |  |  |  |  |  |  |
| C |  |  |  |  |  |  |
| D |  |  |  |  |  |  |

**溶液**

**Pipette solution**

8% cascade blue stock 25 µl (final 2%)

0.05 M TBS 75 µl

**PBS-X** (total 550 ml程度)

20% Triton X-100 2.75 ml final 0.1%

in PBS 547.25 ml

**PBS-XG** (150 ml程度)

normal goat serum 1.5 ml (final 1%)

sodium azide 30 mg (final 0.02%)

in PBS-X 148.5 ml

**10%NGS in PBS-X** (5 ml程度)

normal goat serum 0.45 ml (final 10%)

in PBS-XG 4.55ml

**1st antibodies** ([Miyazaki *et al.*, 2003](#_ENREF_2)) (200倍希釈、原液200 µg/ml)

VGluT2 (guinea pig anti-VGluT2, frontier science, VGluT2-GP-Af670)

in PBS-XG

**2nd antibody** (1000倍希釈) (原液 2 mg/ml) (1–1000 µg/ml final推奨)

Alexa Fluor 633-labeled goat anti-guinea pig IgG (A-21105)

in PBS-XG

**Mounting medium**

250 mg triethylene diamine

5 ml glycerol

5 ml PBS

**2 % Gelatin液**（50°Cに温めて溶かし、室温に冷ましてから使用）

Gelatin 0.4 g

in PBS 20 ml

**Reagents**

VGluT2-GP-Af670: すべて20 µg, \36,750

A-21105: 0.5 ml, \41,000

VECTASHIELD Hard set: H-1400, 10 ml, \18,000

**文献**

Molecular Probes: Cascade Blue and Lucifer Yellow Probes, mp00453

Kawaguchi, Y. & Kubota, Y. (1996) Physiological and morphological identification of somatostatin- or vasoactive intestinal polypeptide-containing cells among GABAergic cell subtypes in rat frontal cortex. *J Neurosci*, **16**, 2701-2715.

Miyazaki, T., Fukaya, M., Shimizu, H. & Watanabe, M. (2003) Subtype switching of vesicular glutamate transporters at parallel fibre-Purkinje cell synapses in developing mouse cerebellum. *Eur J Neurosci*, **17**, 2563-2572.

Oga, T., Okamoto, T. & Fujita, I. (2009) 標的神経細胞の樹状突起の可視化：(Ⅰ) 軟固定大脳皮質への細胞内色素注入法. *Nou21*, **12**, 71-76.