**抗RFP抗体によるtdTomatoシグナルの増感法**

**(浮遊法)**

1. 神経細胞にtdTomatoを発現する。

2. 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。

3. 30%スクロースで落とす。

4. 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）。

5. クライオスタット (-20°C) で20 µm厚に薄切する。24ウェルプレート不凍液に収穫。

6. PBS wash

以下遮光、室温

7. 0.3%H2O2 in PBS, 30 min on shaker

8. PBS wash

9. 10% NGS in PBS-XCG, 30 min on shaker

10. 1st antibody in PBS-XCG, ON on shaker

11. PBS-X wash

12. 2nd antibody in PBS-XCG, 2 hr on shaker

13. PBS-X wash

14. ABC reaction, 2 hr on shaker

15. PBS wash

16. TBS wash

17. Peroxdase/DAB reaction with nickel-enhancement, in Dark, 30–60 (45) min

18. 2% sodium azide in PBS 5 min

19. PBS wash

20. ゼラチンコートスライドガラスにマウントする。

21. 風乾 (30 min)。

22. PB wash

23. dw wash (0.2M acetate bufferをドーゼに2–3 ml加える)

24. 0.7% Neutral Red, 30–40 (30) min

25. dw wash (0.2M acetate bufferをドーゼに2–3 ml加える)

26. 70–95% EtOH (0.2M acetate bufferをドーゼに2–3滴加える)

27. 100% EtOH

28. Xylene

29. EUXITTで封入

**溶液**

**PBS-X** (total 550 ml程度)

30% Triton X-100 5.5 ml (final 0.3%)

in PBS 544.5 ml

**PBS-XCG** (150 ml程度)

lambda-carrageenan 0.18 g (final 0.12%)

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-XCG** (5 ml程度)

normal goat serum 0.45 ml (final 10%)

in PBS-XCG 4.55ml

**0.3 % H2O2 in PBS** (5 ml程度)

30% H2O2 0.05 ml

in PBS 4.95 ml

**1st antibody**

RFP Antibody Pre-adsorbed, Rabbit Polyclonal (Rockland, 600-401-379) (2,000倍希釈)

Or

DsRed Antibody, Rabbit Polyclonal (Clontech, #632496) (2,000倍希釈)

in PBS-XCG

**2nd antibody** (BA-1000, Vector laboratory) (150倍希釈)

biotinylated goat anti-rabbit IgG (final 10 µg/ml)

in PBS-XCG

**ABC反応液**（使用30 min前に作成）(approx. 1:100)（例：4 ml）

A液 1滴 (40 µl) VECTASTAIN Elite ABC kit

B液 1滴 (40 µl) VECTASTAIN Elite ABC kit

in PBS-X (4 ml)

**Ni-DAB反応液**（total 50 ml） ＜in Dark＞）

DAB 10 mg (final 0.02%)

0.05M TBS 45 ml

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 150 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 0.0009% H2O2, Original 0.001%)

**その他の溶液**

**0.7% Neutral red stock solution** (新しい物より年季の入った物の方がよく染まるらしい)

3.5 g Neutral red

500 ml 30% ethanol

6.25 ml 0.2M acetate buffer

filtration

**0.2M acetate buffer (pH3.3)** （pH測定不要）

96.9 ml 0.2M acetic acid

3.1 ml 0.2M sodium acetate

**0.2M acetic acid**

1.16 ml 100% acetic acid

d.w. to 100 ml

**0.2M sodium acetate**

1.64 g/L sodium acetate (andydrous)

or

2.72 g/L sodium acetate (trihydrate)