**tdTomatoによる神経軸索の標識 (DeRed抗体染色)**

**(浮遊法)**

①tdTomato発現

1. JAX Ai14TMラインにCreリコンビナーゼ活性を導入し、神経細胞にtdTomatoを発現する。

②固定・凍結包埋・薄切

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 (-18℃)で 40–50 µm厚に薄切する。24穴プレート不凍液に収穫。

6. PBSでコンパウンドを洗う。

③一次抗体・二次抗体・TSA・発色 (すべて室温)

7. PBS wash

8. 0.3%H2O2 in PBS, 30 min

9. PBS wash

(10. PBS-XCG, 30 min)

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

12. PBS-X wash

13. 2nd antibody in PBS-XCG, 2 hr

14. PBS-X wash

15. ABC reaction, 1hr

16. PBS wash

17. BT-GO reaction, 30 min on shaker ([Kuramoto *et al.*, 2009](#_ENREF_3))

18. PBS wash

19. ABC reaction, 1hr

20. PBS wash

21. TBS wash

22. Ni,DAB reaction, Dark, 30-60 min

23. 2% sodium azide PBS wash

24. PBS wash

25. PB wash

④マウント

26. ゼラチンコートスライドガラスにマウントする。

27. 風乾 (1h)。

⑤カウンター染色・脱水・透徹・封入

28. PB wash

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

30. 0.7% Neutral Red, 30-40 min

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

32. 70-95%EtOH (0.2M acetate bufferをドーゼに２～３滴加える)

33. 100%EtOH

34. Xylene

35. EUXITTで封入

**溶液**

**PBS-X** (total 550 ml程度)

30% Triton X-100 5.5 ml final 0.3%

(optional: 0.02% thimerosal (thiomersal, merthiolate))

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

**0.3 % H2O2 in PBS** (total 50 ml)

30% H2O2 0.5 ml

in PBS 49.5 ml

**1st antibody** (Clontech, #632496) (5000倍希釈) (total 12 ml)

Rabbit anti-DsRed Polyclonal Antibody 2.4 µl

in PBS-XCG 約12 ml

**2nd antibody** (BA-1000, Vector laboratory) (150倍希釈、マニュアル通りに溶かせば原液1.5 mg/ml) (total 12 ml)

biotinylated goat anti-rabbit IgG原液 80 µl (final 10 µg/ml)

in PBS-XCG 12 ml

**ABC反応液**（total 12 ml）2回使い回す（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

**BT-GO solution** (total 50 ml)

BT 0.5 µl (2 µl stock) (125 mM) (final 1.25 µM biotin-tyramine)

glucose oxidase 50 µl stock (3 mg/ml) (final 3 µg/ml)

β-D-glucose 100 mg (final 2 mg/ml) (最後に加える)

BSA 0.5 g (final 1%)

in 0.1M PB (pH 7.4) メスアップして50 ml

**Ni-DAB反応液**（total 50 ml） ＜in Dark＞）

　 DAB 10 mg (final 0.02%)

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 　 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 0.0001%)

**BT stock solution　(80 µl stock)** ([Itoh *et al.*, 1979](#_ENREF_2); [Bobrow *et al.*, 1989](#_ENREF_1))

(i) tyramine HCl 1.83 mg in 36.5 µl DMSO

(ii) biotin-NHS 3.41 mg in 36.5 µl DMSO

1. Mix (i) and (ii)

2. Place one overnight at RT

3. Add 7 µl 2-aminoethanol (monoethanolamine)

4. Stock at 4°C for up to 2 months

**Reagents**

Tyramine HCl: Sigma

Biotin-NHS: EMD Biosciences (Merck) or Sigma H1759

2-aminoethanol: Wako

Glucose oxidase: Nacalai tesque, 16831-14

β-D-glucose: Nacalai tesque

**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)

**文献**

Bobrow MN, Harris TD, Shaughnessy KJ, Litt GJ (1989) Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. Application to immunoassays. J Immunol Methods 125:279-285.

Itoh K, Konishi A, Nomura S, Mizuno N, Nakamura Y, Sugimoto T (1979) Application of coupled oxidation reaction to electron microscopic demonstration of horseradish peroxidase: cobalt-glucose oxidase method. Brain Res 175:341-346.

Kuramoto E, Furuta T, Nakamura KC, Unzai T, Hioki H, Kaneko T (2009) Two types of thalamocortical projections from the motor thalamic nuclei of the rat: a single neuron-tracing study using viral vectors. Cerebral cortex (New York, NY : 1991) 19:2065-2077.