

[Tomato Lectin Fluorescent Dye Conjugate によるマウス血管の染色法]

プロトコルおよびデータ提供元

国立研究開発法人理化学研究所

脳神経科学研究センター細胞機能探索技術研究チーム

濱裕先生、宮脇敦史先生

本法は新生仔からアダルトまでのマウス全身の血管を Tomato Lectin-Fluorescent Dye によって蛍光染色する簡便な方法である。手持ちの laser line の種類（波長）と多重染色の際の色の組合せを考えた上で目的とする色を適宜選択して使い分ける必要がある。特に各色素の蛍光のスペクトルをよくチェックして蛍光物質間の crosstalk が生じないように注意する。特に、蛍光フィルターの選択を慎重に行う必要がある。

下記の蛍光物質標識済み Tomato Lectin が Vector Labs 社から入手可能である

- FITC conjugate (DL-1171)
- Texas Red conjugate (DL-1176)
- DyLight 488 conjugate (DL-1174)
- DyLight 594 conjugate (DL-1177)
- DyLight 649 conjugate (DL-1178)

筆者の経験から、DyLight conjugate series は明るい蛍光を呈するが、長時間の励起光の照射でやや褪色する。

また、Alexa Fluor 633 や Alexa Fluor 546 の標識物は市販されていないため、Biotinylated Tomato Lectin (B-1175)と例えば、Alexa Fluor 633-labeled Streptavidin Alexa Fluor 633-conjugate (Thermo Fisher Scientific, S21375)や Alexa Fluor 546 (Thermo Fisher Scientific, S11225)と Biotinylated Tomato Lectin (Vector Labs, B-1175)を混合し 37 °C で 1 時間 incubation して結合させることで形成された複合体を含む混合液を用いて同様な染色を行う。

[血管染色プロトコール]

(試薬)

A. Heparin -Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, 滅菌は不要) (pH 7.4)

HBSS 500 ml に対して Heparin (Novo-Hepari, Heparin 注射液, 5,000 単位/ 5 ml)

を 2 ml (2,000 単位)加えてよく混和後、氷冷する。アダルトマウス 1 匹当たり 20 ml を使用する。

B. (例) Lectin- Texas Red (400~500 μ l)を 7 ml の HBSS で希釈し氷冷する。

この全量をアダルトマウス 1 匹に用いる。

C. 4% (w/v) PFA/PBS(-) (pH 7.6-7.8), (氷冷)。アダルトマウス 1 匹当たり 40 ml を使用する。

(操作)

Step 1. マウスを麻酔後、保定・開胸を行う。

Step 2. 右心房に割を入れ、左心室から Heparin-HBSS 30 ml を 10 ml ずつ注入し、血液を除くとともに血管内を洗浄する (23 ゲージ注射針を付けた 10 ml 用シリンジで HBSS を注入。注入速度は毎分 約 10 ml)

Step 3. Lectin-Texas Red/ Heparin-HBSS 全量 (7.4 ml)を同様にして注入する。
注入速度は毎分約 5 ml。

Step 4. Lectin-Alexa633/ Heparin-HBSS 注入後、約 40 秒間室温でマウスを静置。

Step 5. 4% (w/v) PFA/PBS(-) (pH 7.6-7.8) 40 ml を 10 ml ずつ同様にして注入し、全身を固定する。注入速度は毎分 10 ml 程度。

Step 6. 目的臓器を摘出 4% (w/v) PFA/PBS(-) (pH 7.6-7.8)中に浸漬。4 $^{\circ}$ C, 12~72 時間。

Step7. PBS で洗浄する。

Step8. ビブラトームを用いてスライスを作成する (必要に応じて 0.2-3 mm 厚等)

【透明化: SCALEVIEW[®]-S 処理】(脳スライスサンプル (1-2 mm) の透明化例)

Step9. 5 ml の SCALEVIEW[®]-S0 が入ったチューブにサンプルを移し、シェーカー (10 rpm) で 37 $^{\circ}$ C、30 分間振とうする。

Step10. 5 ml の SCALEVIEW[®]-S1 が入ったチューブにサンプルを移し、シェーカー (10 rpm) で 37 $^{\circ}$ C、30 分間振とうする。

Step11. 5 ml の SCALEVIEW[®]-S2 が入ったチューブにサンプルを移し、シェーカー (10 rpm) で 37 $^{\circ}$ C、30 分間振とうする。

Step12. 5 ml の SCALEVIEW[®]-S3 が入ったチューブにサンプルを移し、シェーカー (10 rpm) で 37 $^{\circ}$ C、30 分間振とうする。

Step13. 5 ml の deScale Solution が入ったチューブにサンプルを移し、シェーカー（10 rpm）で 4°C、30 分間×2 回振とうする。

Step14. 5 ml の SCALEVIEW-S4 が入ったチューブにサンプルを移し、シェーカー（10 rpm）で 37°C、12-24 時間振とうする。

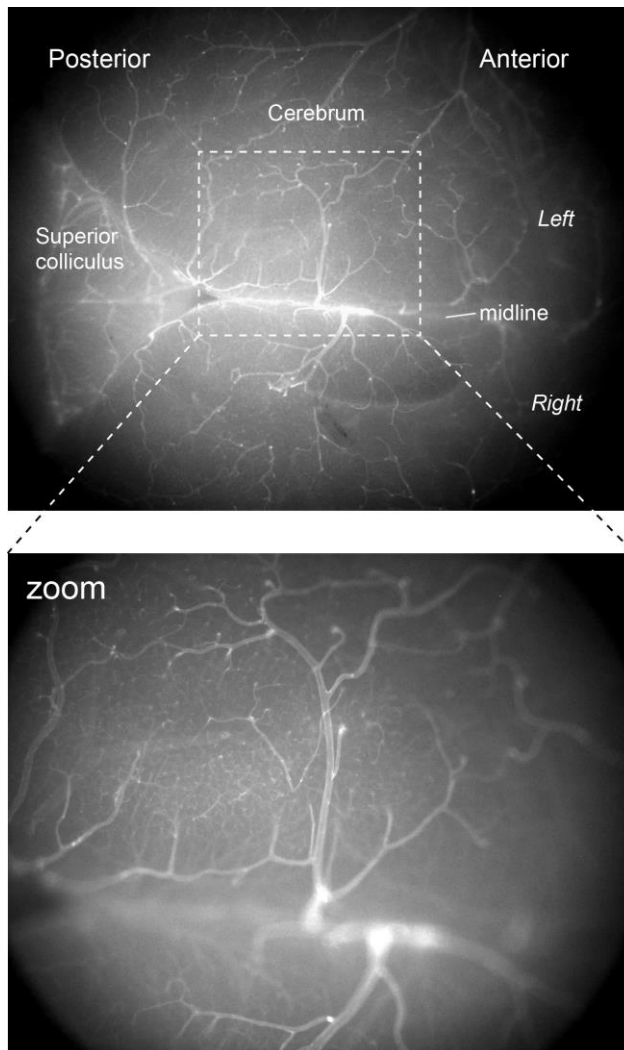
Step15. この時点で、組織が適度に透明化されていることを確認する。

Step16. 5 ml の SCALEVIEW[®]-SMt が入ったチューブにサンプルを移し、シェーカー（10 rpm）で 37°C、1 時間振とうする。

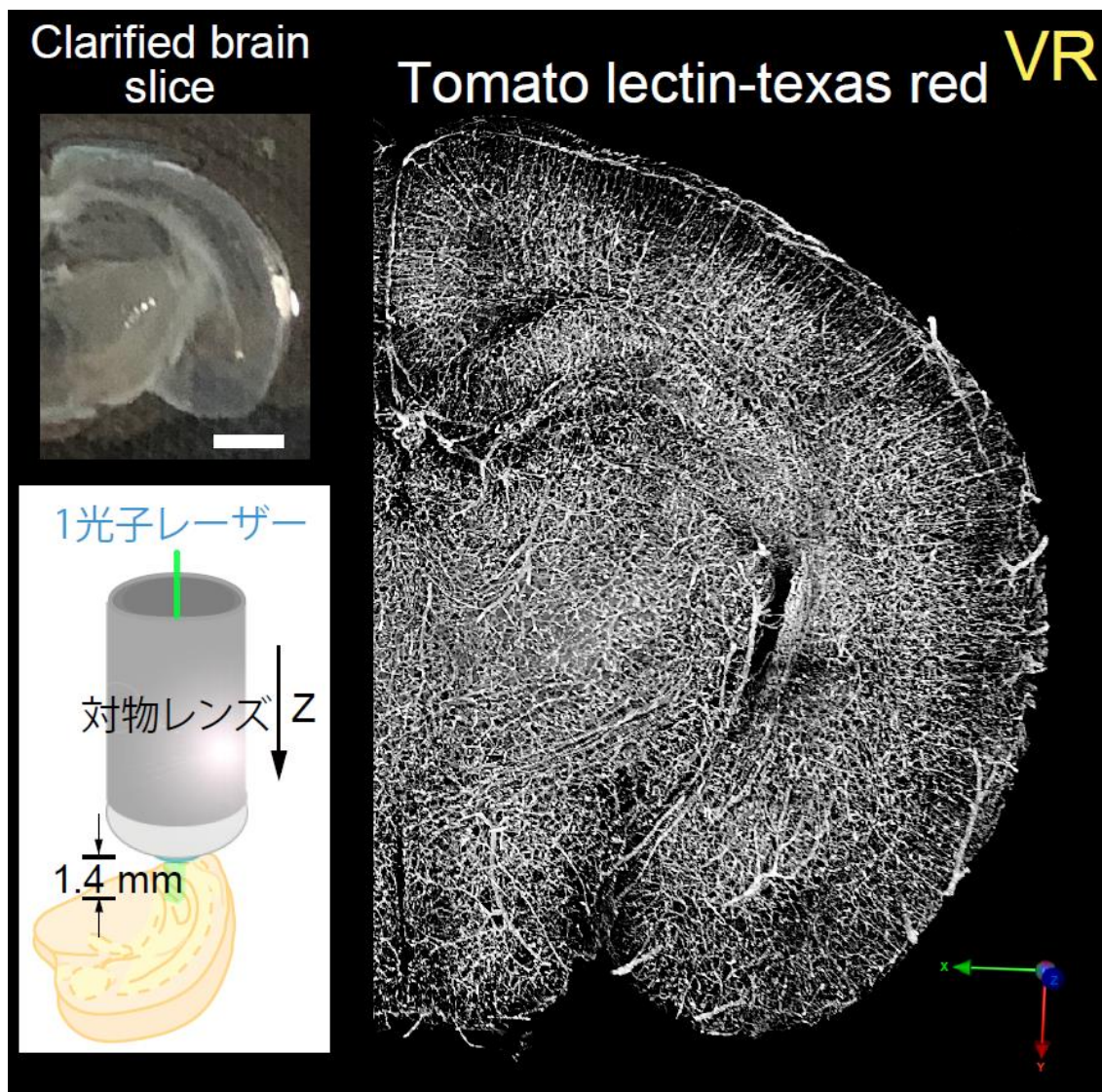
【観察】

Step17. SCALEVIEW[®]-S 処理した脳サンプルを SCALEVIEW[®]-SMt に浸した状態で共焦点レーザー顕微鏡若しくは 2 光子励起顕微鏡を用いて観察する。

染色後のマウス大脳を蛍光実体顕微鏡により観察した。画像を次頁に示す。



Tomato lectin-texas red で血管染色を行なった新生仔マウス(C57BL6/J、生後 10.5 日)大脳の冠状断スライス (厚さ 1.2 mm) (左上)を透明化し、正立共焦点レーザー走査型顕微鏡(CLSM)で観察 (左下) した VR 画像 (右)。



以上。