

製品データ No. 184

FluoroMyelin™ Green を用いた髄鞘の蛍光染色

2005 年 5 月

データの提供：国内研究所の研究者

実験の概要

神経系の組織切片での髄鞘染色としては 1953 年に Klüber と Barrera によって報告された Luxol fast blue を用いる方法が広く用いられており、Cresyl violet によるニッスル染色と組み合わせた KB 染色 (Klüber Barrera 染色) は神経系の組織学における代表的染色法である。しかしこの染色はパラフィン切片で行うことが基本で、凍結切片でも可能とはされているが、パラフィン切片ほどの安定した美しい染色を得ることは困難である。したがって凍結切片を用いて髄鞘染色を行うには、MBP (myelin basic protein) や CNP (2',3'-cyclic nucleotide-3'-phosphohydrolase) などの髄鞘のマーカー蛋白に対する抗体を用いて免疫染色を行うことが多い。Molecular Probes™ から発売された BrainStain™ Imaging Kit (B34650) には髄鞘染色用の FluoroMyelin™ Green、ニッスル染色用の NeuroTrace® 530/615 の 2 種類の蛍光物質 (さらに核染色用の DAPI) が含まれており、凍結切片において KB 染色と同様の染色効果が簡便な操作で、しかも短時間で得られることがわかった。

方法

4% paraformaldehyde / 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2) 灌流固定したマウス脳を用いて厚さ 8 μm の凍結切片を作成し、スライドガラスに貼り付けて乾燥した後、以下の手順で染色を行った。

1. 前処置：切片を 0.2% Triton®-X 添加 phosphate-buffered saline (PBS) に 20 分浸す。
2. 染色：FluoroMyelin™ Green、NeuroTrace® 530/615、DAPI のうち同時染色したい任意の組み合わせの蛍光物質をそれぞれ 300 倍希釈となるように PBS に混合し、切片に投与して室温 20 分反応させる。
3. 洗浄：0.2% Triton®-X 添加 PBS で 10 分 x 3 回洗浄。

この後、無蛍光 glycerol で封入し、共焦点レーザー顕微鏡で観察 (FluoroMyelin™ Green は FITC と同じ観察条件、NeuroTrace® 530/615 は Rhodamine や Cy™3 と同じ観察条件)。

結果・考察

図 1A-D はマウス脳の FluoroMyelin™ Green による髄鞘染色と、同じような部位のパラフィン切片を用いた KB 染色を比較したものである。両者は非常に良く似た髄鞘染色効果を示していることがわかる。この染色にはキットに添付のマニュアルに記載された組成の PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 7.4) を用いたが、通常の免疫染色で用いられる 0.01 M PBS (154 mM NaCl, 7.3 mM Na₂HPO₄, 2.7 mM NaH₂PO₄, pH 7.2) でも結果は大差ない (図 1 E, F)。

注意しなければならないのは Triton®-X の効果で、免疫組織化学では抗体の浸透を良くするために、抗体希釈液に Triton®-X を添加した PBS を用いることが良くあるが、FluoroMyelin™ Green の場合には希釈液に Triton®-X を加えると極めて染色性が落ちる。また前処置および洗浄にも場合によっては Triton®-X を加えない方がよい場合がある。たとえばピクリン酸を含む Zamboni 液で灌流固定した組織では FluoroMyelin™

Green での染色性が劣る傾向が見られたので、こうした固定組織を用いて前処置および洗浄時に Triton®-X 添加の有無を比較してみた。図 2 はラット脊髄での染色例であるが、洗浄段階で Triton®-X を用いると染色性が激減している。また前処置段階でも Triton®-X を加えない方が染色性が強い。従ってプロトコールどおりの処置では期待される染色性が得られない場合、染色時間を長くすることは一つの有効な手段であるが、すべての工程を Triton®-X なしで行い、濃く染色された場合には洗浄時間を長くする、Triton®-X を加えて洗浄することなどによって適度の染色性を得ることが可能と思われる。

FluoroMyelin™ Green を用いる髄鞘染色は最短の場合、1 時間程度で完了する。これは Luxol fast blue で一晚の反応を必要とする KB 染色に比べると簡便であるが、この方法の最大のメリットは凍結切片で髄鞘染色と適当な抗体を用いた免疫染色による多重染色が簡単に行える点であろう。図 3 はそのような例であるがこうした染色の場合にも、抗体染色に Triton®-X を用いる場合には先に行い、次に FluoroMyelin™ Green 染色を時間をかけて行うなどの工夫が必要である。

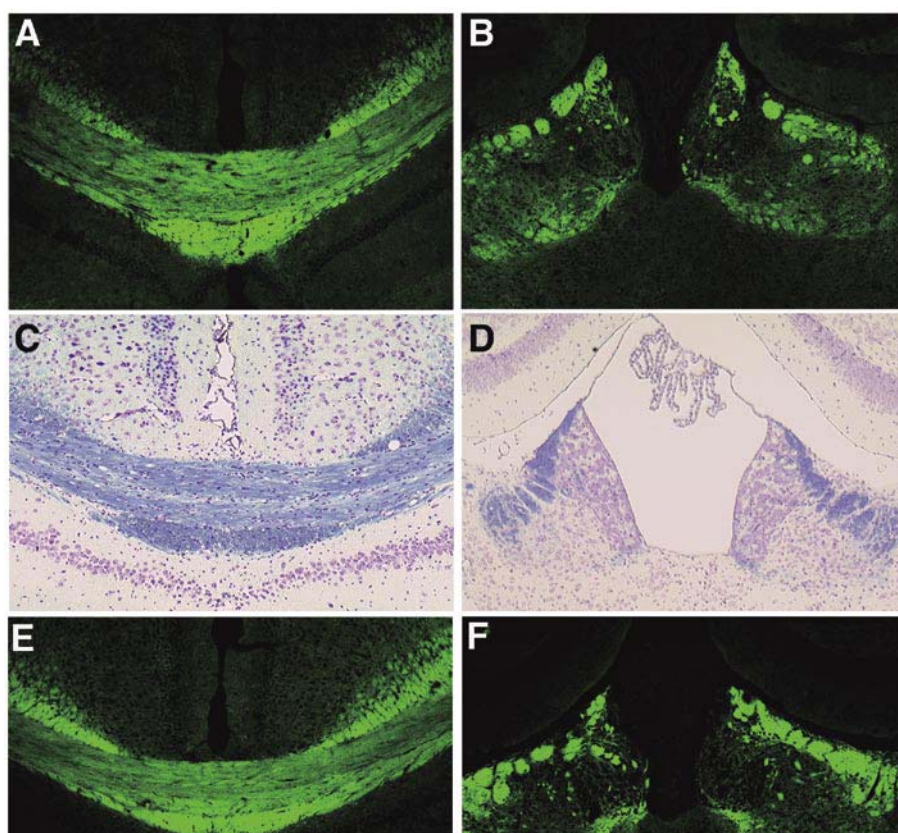


図 1: FluoroMyelin™ Green で染色したマウスの corpus callosum(A)、habenula(B) および同部位の KB 染色 (C, D)。希釈に用いた PBS は添付書類の説明書の組成の物を使用。E, F は同じ部位を 0.01 M PBS で希釈した FluoroMyelin™ Green で染色した物。それぞれの PBS の組成は本文を参照。

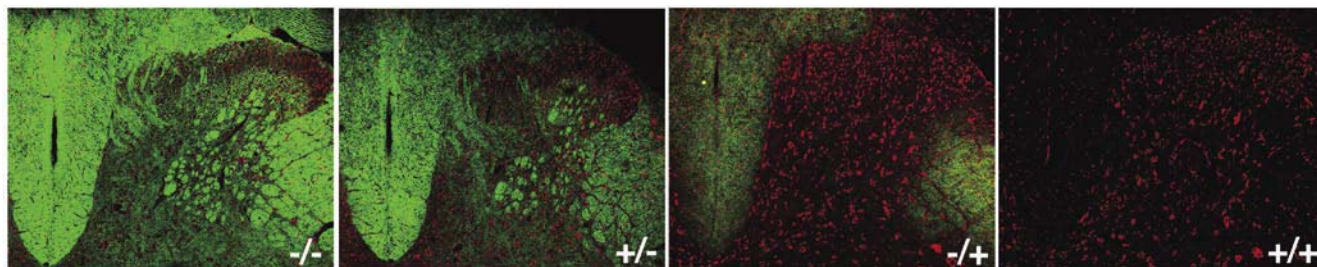


図 2: 各工程での 0.2% Triton®-X の影響。標本は Zamboni 液で灌流固定したラット脊髄。各図のハイフンの前後の +、- はそれぞれ前処置および洗浄過程での Triton®-X の有無を示す。緑色蛍光は FluoroMyelin™ による髄鞘染色、赤色蛍光は NeuroTrace® 530/615 によるニッスル染色を示す。

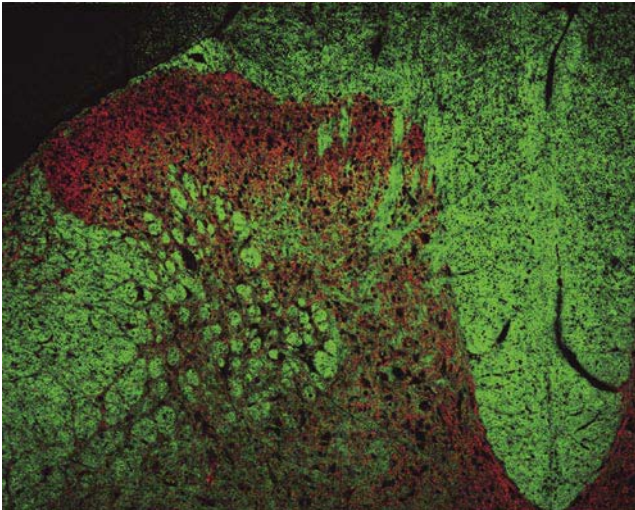


図 3: Zamboni 液で灌流固定したラット脊髄の凍結切片での抗 GAD 抗体と FluoroMyelin™ による二重染色の例。緑色蛍光は FluoroMyelin™ による髄鞘染色、赤色蛍光は灰白質に認められる GAD 免疫反応を示す。

Triton® is a registered trademark of Rohm & Haas, Co.

製品情報

製品名	製品番号	サイズ
BrainStain™ Imaging Kit	B34650	1 kit
FluoroMyelin™ Green Fluorescent Myelin Stain	F34651	1 ml

価格については、ウェブをご覧ください。

研究用のみ使用できます。診断目的およびその手続き上での使用は出来ません。
記載の社名および製品名は、弊社または各社の商標または登録商標です。
標準販売条件はこちらをご覧ください。www.lifetechnologies.com/TC
The trademarks mentioned herein are the property of Life Technologies Corporation or their respective owners.
© 2012, Life Technologies Japan Ltd. All rights reserved. Printed in Japan.

ライフテクノロジーズジャパン株式会社

本社：〒108-0023 東京都港区芝浦 4-2-8
TEL.03 (6832) 9300 FAX.03 (6832) 9580

www.lifetechnologies.com

大阪：〒564-0052 大阪府吹田市広芝町 10-28
TEL.06 (6339) 8165 FAX.06 (6339) 8138

