

Department of Neurobiology and Behavior Gunma

University School of Medicine

年 月 日

マウス灌流固定：

1 , 4% paraformaldehyde 固定液：

(ドラフト内でマグネティックスターラーを使って作る)

20 gms paraformaldehyde

dissolve in 250 mls DW at 60 (水が 60 になったら加熱するのを止めてパラホルムアルデヒドをいれる。)

clear with 1M NaOH drop by drop (約 300 μ l)

filter before use.

add equal volume of stock 0.2 M phosphate buffer (pH 7.4)

Sodium Phosphate Buffers 0.2M stock :

71.6 gms/ liters $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (dibasic) (アルカリ)

31.2 gms/ liters $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (monobasic) (酸)

for 0.2 M pH7.4

420 mls stock dibasic

80 mls stock monobasic

10xPBS 液：

NaCl 80 g

KCl 2 g

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9g

KH_2PO_4 2 g

add H_2O to 1 L

2 , 灌流使用器具：

ローラーポンプ (マウス固定用)

解刮用具

23Gx1 ゲージ注射針

3 , 試薬：

1 x PBS 液、4% paraformaldehyde 固定液、ネンブタール

4 , 操作：

アダルトマウスを 0.1 ml / 100mg 体重にネンブタールを腹腔注射して麻酔。(実際 0.05 ml/40 mg BW の容量で 2 分で完全麻酔できる)

肋縁下部腹部をまず横に切って、肋骨の両側から内胸動脈を切

らないように縦に切開し、肋骨を裏返して心臓を露出させる。
右心房を切開し、素早く左心室先端から針をさし（手持ち）、
ローラーポンプで

1 × PBS、4% paraformaldehyde 固定液順に灌流固定する。

ローラーポンプメモリは x10、4 (2.80 ml/min) を使う

1 × PBS 液 5 分、約 14 ml

4% paraformaldehyde 10 分、約 28 ml

環流固定後、脳を取り出し、同固定液に 2-12 hr. 後固定する。