

蛍光タンパク質観察用植物組織固定法

(2008年6月12日 稲田のりこ)

用意するもの: Paraformaldehyde (粉末)
 NaOH 溶液 (~10 M)
 200 mM PIPES (pH 7.0)
 1x PBS

< 固定液の調整 >

1. ここではタマネギ表皮組織の場合、2% PFA、100 mM PIPES の固定液を調整する。適量の PFA 粉末 (100 mL の固定液に対し 2g) をファルコンチューブに取り、蒸留水を少量 (5 mL くらい) 入れる。
2. ビーカーにお湯を注ぎ、お湯の中にファルコンチューブを浸ける。ファルコンチューブを時々攪拌しつつ、均等に濁ってきたら、NaOH を一滴ずつ垂らし、熱とアルカリで PFA を完全に溶かす。
3. 完全に溶けたら、PIPES のストック溶液と水でメスアップ、最終的に 2% PFA、100 mM PIPES の溶液を作る。

< 固定 >

1. タマネギ表皮組織の場合、表皮組織を丁寧にはぎ取り、寒天の上に配置 (表皮組織を溶液に直接浸けると、巻きやすくなり、観察出来なくなる。また、タマネギ片を直接固定すると、表皮細胞をはぎ取ることが出来ない)。横から固定液を垂らす。その他組織・培養細胞の場合、直接固定瓶に組織と固定液を入れる。
2. 室温、暗所で一時間インキュベート。
3. 固定液を捨て、1xPBS で 10 分間 3 回洗う。