

Mouse RPE flat mount IF staining

20200211 송주하

준비물]

VANNAS Iris spring scissors (straight, sharp points, Cat.no: 2031C)

Micro dissecting forceps (straight, sharp points)



Blocking buffer: 5% BSA, 0.3% Triton-X in PBS

Antibody solution: Pblec buffer

(PBS, pH 6.8, containing in mM; 1 CaCl₂, 1 MgCl₂, 0.1 MnCl₂, 1% Triton X-100)

Vectashield mounting medium (Vector lab, Cat.no: H1000)

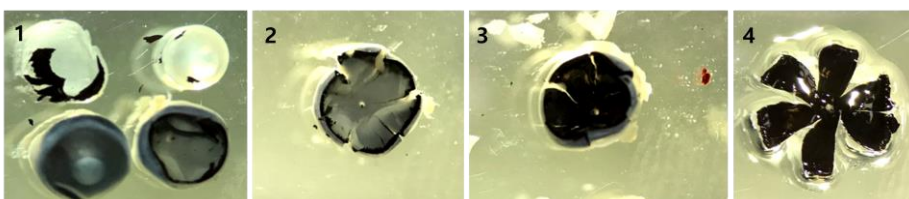
Slide & cover slide

[Isolation of mouse RPE-choroid complex]

1. 마우스를 안락사 시킨 후 iris spring scissor와 micro forceps을 이용하여 안구를 손상 없이 적출
2. 안구를 곧바로 4% paraformaldehyde 1ml이 담긴 e-tube에 넣음.
3. 4°C 냉장고에 1~2시간 넣어 고정시킴.
4. 4% paraformaldehyde를 모두 빼내고 깨끗한 PBS 1ml로 치환시킴.
이렇게 치환된 세포는 냉장보관하고 최소 24시간 이내에 염색에 들어가는 것이 좋음.

[Flat mount IF staining]

1. PBS가 담긴 petridish에 안구를 놓고 실체 현미경 하에서 안구에 붙어있는 결체조직과 근육, 시신경 등을 깨끗하게 제거함.
2. Iris scissor와 micro forceps를 이용하여 안구 앞부분을 잘라냄 (그림 1).
3. 시신경을 중심으로 방사형으로 약 6-8개 조각이 되도록 자름 (그림 2).
4. retina를 제거함 (그림 3).
5. 꽃모양으로 잘린 RPE-choroid를 밀이 넓은 e-tube에 넣음
같은 균으로 같은 염색을 실시할 조직들은 한 e-tube에 최대 10개까지 넣어도 됨.



6. Blocking: blocking buffer를 300 μ l 넣고 상온에서 1시간 incubation.
7. Primary antibody: blocking buffer를 조직이 손상되지 않게 잘 제거한 후, Antibody solution으로 희석한 primary antibody를 300 μ l 넣고 차광하여 4 $^{\circ}$ C 냉장고에서 overnight incubation
8. Washing: PBS를 1ml씩 넣고 시소쉐이커에 10분씩 6번 실시.
9. Secondary antibody: antibody solution 또는 PBS에 희석한 secondary antibody (+DAPI)를 300 μ l 넣고 차광하여 상온에서 1시간 incubation.
10. Washing: PBS를 1ml씩 넣고 시소쉐이커에 10분씩 6번 실시.
11. Mounting: 조직을 forcep으로 e-tube에서 조심스럽게 꺼내 슬라이드에 RPE가 위로 향하도록 올려놓고 Vectashield를 그 위에 한 방울 떨어뜨려 커버슬라이드를 덮음 (그림 4).
12. 촬영

