

ES 細胞のアルカリフォスファターゼ染色

ES 細胞の分化状態をモニターするのに使われる。未分化な ES 細胞はアルカリフォスファターゼ活性を持つため以下の操作で赤く染色される。

試薬

- NAPHTHOL AS-BI PHOSPHATE
SIGMA N2125 100 mg (200 サンプル分)。0.5 mg / 10 μ l (100 mg / 2 ml) の N,N-ジメチルホルムアミド溶液にして -20 $^{\circ}$ C 保存。
- FAST RED VIOLET LB SALT
SIGMA F3381 100 mg (200 サンプル分)。0.5 mg / 10 μ l (100 mg / 2 ml) の N,N-ジメチルホルムアミド溶液にして -20 $^{\circ}$ C 保存。
- 1 M Tris-Cl PH 8.5
- 10% ホルマリン (3.5%ホルムアルデヒド)
ホルマリン (35%ホルムアルデヒド液) を水で希釈して 3.5% ホルムアルデヒド溶液にしたもの。遮光室温保存。

操作

1. 35 mm dish に用意した ES 細胞の培地をアスピレートして捨てる。
2. 10% ホルマリン 1 ml を静かに加え 15 分間固定する。
3. 上清を捨て、水 1 ml を静かに加え 5 分間洗浄する。
4. dish 1 枚あたり次の分量の試薬を次の順序で混合する。試薬は混合したら直ちに使用しないと濁ってくるので 3. の洗浄操作中に混合するのが良いと思う。

水	0.9 ml
1 M Tris-Cl PH 8.5	100 μ l
NAPHTHOL AS-BI PHOSPHATE ストック溶液	5 μ l
FAST RED VIOLET LB SALT ストック溶液	5 μ l

5. dish の上清を捨て、4. の染色液 1 ml を静かに加え、5-10 分間染色する。
6. 観察する。コロニー全体が赤く染まるものは未分化であると考えられる。コロニーの中央のみが赤く、周辺は染色されないようなコロニーはすでに分化を開始していると判断する。

<サンプルを保存する場合は以下の操作を続けて行う>

7. 上清を捨て、水 1 ml を静かに加え、10 分間洗浄する。
8. 上清を捨て、ホルマリン (原液) 2 ml を静かに加える。

<以上>