

実験 C DAPI 染色による核の形態の観察

(文責：杉本亜砂子 10/2002)

<目的>

DAPI で線虫の核を染色し、組織・器官・細胞周期による核の形態の特徴を観察する。

<手順>

- 1) プレートに 500ul の PBS を加えて線虫を 1.5ml チューブに回収する。
 - 実験 A で作成した male plate を用いる。
- 2) 3000rpm で 30 秒遠心し、上清をできるだけ除く。(線虫を吸わないように注意。)
- 3) 100ul の PBS および 300ul のメタノールを加えてよく混合し、室温で 10 分おく。
 - 固定が甘くて染まりが悪かった班があったので、固定時間はもっと長くした方が良いかもしれない。
- 4) 3000rpm で 30 秒遠心し、上清を除く。
- 5) PBS 1ml を加えて 6000rpm で 30 秒遠心し、上清を除く。
- 6) DAPI mounting medium 2ul をスライドガラス上にスポットし、5) の線虫懸濁液 3ul を加えて混合する。カバーガラスをのせ、マニキュアでシールする。
- 7) 蛍光顕微鏡で観察する。
 - 蛍光物質および蛍光顕微鏡の仕組みについては板書で解説。
 - 蛍光と微分干渉を切り替えながら、あるいは重ねて見ると解りやすい。

<課題>

- 1) 雌雄同体と雄の成虫を探し、全体の構造を比較する。
- 2) 神経・腸・生殖細胞・胚の核を同定し、それらの形態の差異について記述する。
- 3) 雌雄同体と雄の生殖細胞を比較し、卵と精子(およびそれらの前駆細胞)の核について詳しく観察する。
 - 班ごとにモニタ上で大まかに解説してから、一人ずつ観察。一般にモニタに頼りがちな傾向があるので、実際に自分の目で顕微鏡を覗いてスケッチするように指示。写真よりもスケッチの方が伝えられる情報量が多い場合もあることを説明。たとえば、頭の中で 3 次元構築して、(予想)断面図を書いてみる。
 - 配付資料(線虫講習会 1997 解説 1)の図を見ながら観察すると解りやすい。

10X PBS

NaCl	40g
KCl	1g
Na ₂ HPO ₄	3.1g
KH ₂ PO ₄	1g
	per 500ml

autoclave

使用時に 10 倍に薄める。(滅菌水でなくても可)

DAPI mounting medium (こちらで準備)

DAPI (2mg/ml) in 20mM Tris-HCl (pH8.0), 0.2M 1,4-diazabicyclo-2,2,2-octane (DABCO=退色防止剤), 90% glycerol.