

マウス灌流固定のプロトコール

用意する試薬

- | | |
|-------------------|-------------|
| ✓ ヘパリン (原液を10倍希釈) | 0.5 mL |
| ✓ PBS | 20 ~ 50 mL |
| ✓ 4% PFA | 50 ~ 100 mL |
| ✓ イソフルレン | |
| ✓ 後固定溶液 | 20 mL/1組織 |

マウス灌流固定のプロトコール

手順1 麻酔

麻酔は、ペントバルビタール腹腔内麻酔または、イソフルレン吸入麻酔を使用します。

※動画は、イソフルレン吸入麻酔を使用。

導入時の麻酔濃度は4%程度で行ない、呼吸が落ちてきたら、徐々に濃度を下げ（3%～2.5%）
仰向けに固定します。

マウス灌流固定のプロトコール

手順2 開腹

臓器（肝臓など）や横隔膜に傷をつけないように注意しながら、肋骨に沿って開腹します。

※横隔膜に傷をつけると呼吸が停止するので注意します。

横隔膜に肝臓が張り付いている場合があるので、横隔膜と肝臓を綿棒等を使用して剥離します。

マウス灌流固定のプロトコール

手順3 開胸 (開胸すると呼吸が止まるのでここからスピードを要します)

剣状突起をピンセットでつまみ、少し上に持ち上げ、胸骨直下の横隔膜にハサミを入れて穴を開けます。横隔膜に穴を開けると、横隔膜に張り付いていた肺が下に落ちるので横隔膜を切開します。**※肺を傷つけないように注意します。**

剣状突起をつまんで上に持ち上げながら、左右の肋骨を頭部に向かって切開します。

※内胸動脈を傷つけない様に注意する。

剣状突起をつまんだまま、肋骨を頭部側に折り返し、心臓を露出させます。

マウス灌流固定のプロトコール

手順4 左心室にヘパリンを投与

左心室にヘパリン（原液を10倍希釈）を0.1 mL程度投与し、その後すぐに右心耳を切ります。

※1 確実に切開できていないと、血液や灌流液が体外に流出しないので注意します。

※2 右心房などに傷をつけないように注意します。

マウス灌流固定のプロトコール

手順5 左心室にPBSを灌流

生体に、負荷がかからない様に、ゆっくりとPBSを左心室から灌流します。

肝臓の色が白っぽくなり、右心耳からの流出する液が透明になるまで灌流します。

マウス灌流固定のプロトコール

手順6 左心室に4% PFAを灌流

右心耳からの流出液が透明になったら、4% PFAに変えて、ゆっくりと左心室から灌流します。

※1 体内にエアーが入らない様に注意する。

※2 PFAは20 - 50 mL程度灌流します。

全身が硬直してきたら灌流を止めます。

素早く目的の臓器を傷付けないように取り出し、後固定溶液に浸けて保存します。