



MatriMix (511)で包埋培養した細胞の切片免疫染色

抗体濃度や反応条件によって、洗浄工程の回数や時間を調整して下さい。

1. 培地を除去して、ゲルを PBS で洗浄する。
2. 10%ホルマリン/PBS を添加して、室温・振盪条件で一晩固定する。
3. 金属ヘラ（微量用薬さじの後ろを使うと良い）を用いて固定液中のゲルをディッシュから外し、ピンセットで丁寧に摘まんでエッペン等に移動する。
※パラフィン切片；PBS で洗浄した後、脱水処理を行なう。
※凍結切片；PBS で洗浄した後、10% ⇒ 20% ⇒ 30%スクロース置換を行なう。
4. 凍結切片、パラフィン切片の作製は定法に従う。
※切片化したゲルは剥がれやすいので、スライドガラスは接着力の高いもの（推奨 クレストコートスライドガラス, 松浪硝子工業）を使用して下さい。
※パラフィン切片の場合、脱パラ後に賦活化処理する。
（L.A.B. Solution (Liberate Antibody Binding Solution, Polysciences) に浸漬して、室温で5分間振盪する）。
5. ブロッキング液^{注1}を添加して、室温・振盪条件で2時間から一晩処理する。
6. ブロッキング液を除去する。
7. 抗体用希釈液^{注2}で調製した一次抗体液を添加して、4℃で1時間処理する。
8. 一次抗体液を除去して（キムワイブ上で切片のサイドを軽く叩きつけ、切片に付着した液体をきる）、PBST（0.1% Tween-20）での5分間洗浄を3回実施する。
9. 洗浄液を除去する。
10. 一次抗体と同様に希釈した二次抗体液^{注3}を添加して、室温で45分処理する。
11. 二次抗体液を除去して、PBST（0.1% Tween-20）での15分洗浄を3回実施する。
12. 多重染色する場合は、step 7-step 11の過程を繰り返す。
13. 顕微鏡観察する。
※封入剤（例：Fluoromount-G（SouthernBiotech, #0100-01など）を切片に滴下した後、カバーガラスで覆い、観察することも可能です。

注¹ ブロッキング液は、StartingBlock T20 (PBS) Blocking Buffer (Thermo Scientific, #37539)をご利用下さい。透過処理時はサポニンを終濃度 0.1%となるようにブロッキング液で溶解して下さい。

注² 抗体用希釈液は、ブロッキング液を PBST（0.1% Tween-20）で 50%に希釈してご利用下さい。

注³ 二次抗体は、コラーゲン特有の自家蛍光を回避するために、励起波長 400~500 nm 以外の蛍光標識（例：Alexa 594, Alexa 647）された抗体を選択して下さい。