

## 免疫蛍光顕微鏡プロトコール

### サンプルの準備

1. 一晚、チャンバースライドを用いて培養細胞を成長させます。もしくは、ポリ-L-リジンがコーティングされたチャンバースライドに適切な量の細胞を加えて、37°Cで30分以上インキュベートします。細胞の固定化に際しては、50%コンフルエントまでとしてください。
2. PBSで簡単に細胞を洗浄します。
3. 室温で15分間PBSで、4%パラホルムアルデヒドとのインキュベーションによって細胞を固定化します。
4. 3分ごとに、3回PBSで洗浄します。
5. 氷冷のアセトンを加え、-20°Cで10分間インキュベートします。
6. 3分ごとに、3回PBSで洗浄します。

### サンプル・ブロッキング

7. 1% BSA/0.2% Triton X-100/PBS内で二次抗体と同種の5%正常血清サンプルを用いてブロックします。ブロッキングは、室温で1時間、もしくは4°Cで一晩インキュベートしてください。

### サンプル染色

8. 1% BSA/0.05% Triton X-100/PBSで、推奨濃度および希釈法によって、一次抗体を希釈します。
9. チャンバースライドのウェルごとに200  $\mu$ Lずつ(合計8ウェル)加えます。その後、室温で2時間、もしくは4°Cで一晩インキュベートします。
10. 3分ごとに、3回PBSで洗浄します。

**NOTE :** FITCやAlexa Fluor®488に直接結合した一次抗体を使用する場合、ステップ13はとばしてください。

11. 使用する二次抗体データシートに記載された推奨方法に従って1% BSA/0.05% Triton X-100/PBSで蛍光標識二次抗体を調製します。その後、チャンバースライドのウェルごとに200  $\mu$ L(合計8ウェル)加えます。
12. 暗所で、室温、1時間ほど、サンプルをインキュベートします。
13. 3分ごとに、3回PBSで洗浄します。
14. 抗退色封入剤(anti-fade mounting medium)でカバーグラスします。
15. マニキュアを用いてスライドを封着します。

### Solutions and Buffers

#### Phosphate Buffered Saline (PBS):

- 8.0 g NaCl
  - 1.44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
  - 0.24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
  - 0.2 g KCl
- Add ddH<sub>2</sub>O up to 1 L, pH to 7.2 with HCl

#### 1%BSA/PBS:

- 1 g of BSA in 100 mL PBS

トミーデジタルバイオロジー株式会社  
カスタマーサポート  
〒110-0008東京都台東区池之端2-9-1  
TEL : 03-5834-0843 Fax : 03-5815-0813  
mail : [Biolegend@digital-biology.co.jp](mailto:Biolegend@digital-biology.co.jp)