

免疫染色

1) PFA 固定 室温 10min 以上
3.5cm dish の場合 (coverslip が複数枚入っている時) →PFA 1mL/ 35mm dish
6 well plate で 1 枚ずつの場合→PFA 300 μ L/ coverslip

2) PFA をアスピレーターで除去し PBS wash 3mL \times 2 回

3) 0.2% Triton-PBS 1mL 3min

※カットチップを使って Well の壁伝いに入れると穏やかに入れることができる。

※6well dish を少し動かして coverslip が Triton に浸るようにする。

4) Triton をアスピレーターで除去し PBS wash 3mL \times 2 回

※PBS は Cut チップもしくは 5mL マイクロピペットで入れる。

※PBS を吸引するときは coverslip を 6well dish に軽く押し付け、coverslip のふちをなぞる様にする。

※吸引後は、coverslip が乾いてしまわないように注意する。

5) 一抗体反応

一次抗体をカバースリップに 30uL 添加

※ 抗体は BSA-PBS で希釈する。

coverslip が乾いてしまわないよう速やかに乗せる。

例) カバースリップ 12 枚の場合 30uL \times 12= 360uL 必要
→ total 400uL になるよう計算

gH2AX (1:800)	0.5uL
CENPF (1:250)	1.6uL
2% BSA-PBS	400uL

6) 37 $^{\circ}$ C、30min インキュベート

※乾燥しないよう濡らしたペーパータオルをかける

7) PBS wash 3mL \times 2 回

※カットチップで 1mL+ 5mL ピペットで 2mL

免疫染色時の wash 方法→ <https://www.youtube.com/watch?v=Ifh10PipWsY&t=2s>

8) 二次抗体反応

二次抗体をカバースリップに 30uL 添加

例) カバースリップ 12 枚の場合 $30\text{uL} \times 12 = 360\text{uL}$ 必要
→ total 400uL になるよう計算

Mouse488 (1:500)	0.8uL
Rabbit594 (1:500)	0.8uL
2% BSA-PBS	400uL

9) 37°C、30min インキュベート

※インキュベート中に退色防止剤(ProLong Gold)を冷凍庫から出して解凍しておく。

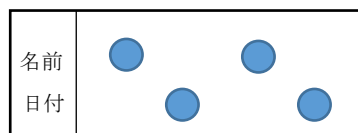
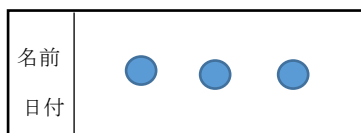
※スライドガラスを用意し、ラベルしておく。

10) PBS wash 3mL×2回

※カットチップで 1mL+ 5mL ピペットで 2mL

11) 退色防止剤(ProLong Gold)をスライドガラスに 5μL ずつ乗せる。

※退色防止剤は粘性が高い。気泡が入らないように乗せる。



12) well 内の PBS を半分ほど除去し、ナイフで coverslip をとり、スライドガラスの上に乗せる (マウントする)。

Coverslip は細胞がいる面を下にして乗せる。

13) 顕微鏡で観察

14) 標本は-20°Cで保存