

Immunofluorescence (IF) Protocol

2014.4 ver.3

1. 24 well プレートに、火炎滅菌したカバーガラス (Micro cover glass, Matsunami #12 丸 No.1) を敷いたのち、Collagen Type IV solution 500 μ l/well を添加し、室温にて一晩震盪する。

Collagen Type IV solution (30 μ g/ml)

Cellmatrix Type IV (新田ゼラチン 3.0 mg/ml) 1 ml を滅菌水 100 ml に希釈する。

2. PBS で 3 回洗浄した後に、細胞を播種する。
3. 適宜、遺伝子導入、薬剤添加などの細胞の処理を行う。
4. アスピレーターにて培地を除去した後、速やかに 3.7% PFA/PBS (4°C 保存) 500 μ l/well を添加して細胞を固定する (RT 15~30 min shake)。

☞ 固定の方法は用いる抗体に応じて適宜変更する。

3.7% PFA/PBS

Paraformaldehyde (Nacalai #26126-54)	3.7 g
Milli-Q H ₂ O	約 80 ml
2N NaOH	20 μ l

55°Cにて溶解後、20×PBS を 5 ml 添加し、Milli-Q H₂O にて 100 ml とする。

5. 0.05% Tween20/PBS 500 μ l/well (RT 5 min shake×3) にて洗浄する。

☞ この状態でパラフィルムなどで覆い 4°C にて保存可能です。

0.05% Tween20/PBS

500 μ l の 20% Tween20 を 200 ml の PBS に添加する。

6. 0.25% Triton X-100/PBS 500 μ l/well (RT 5 min shake×1) にて処理する。

0.25% Triton X-100/PBS

2.5 ml の 20% Triton X-100 を 200 ml の PBS に添加する。

7. 0.05% Tween20/PBS 500 μ l/well (RT 5 min shake×3) にて洗浄する。
8. 2.5% BSA/PBS 500 μ l/well (RT 15~30 min shake) にてブロッキングする。

☞ この状態でパラフィルムなどで覆い 4°C にて保存可能です。

2.5% BSA/PBS

BSA (Bovine Serum Albumin Fraction V, Roche #10735094001)	2.5 g
PBS	約 90 ml

4°C にて一晩静置した後、PBS で 100 ml とする。必要があれば NaN₃ (final 0.1%) を添加する。

9. 0.05% Tween20/PBS 500 μ l/well (RT 1 min \times 1) にて洗浄する。
10. ピンセットを用いてカバーガラスをウェルの中心に移動させた後、1st antibody solution 20 μ l/well をカバーガラスの中央にゆっくりと滴下する。
- ☞ このときチップの先端でカバーガラスを引っ掻くことがないように注意する。
 - ☞ カバーガラスがウェルの側面と接触していると抗体溶液がカバーガラスから落ちるので注意する。
 - ☞ データシート等に記載された抗体の特異性に応じて、希釈率、反応時間等を調節する。
- (下記はあくまで一般的な目安です。)

<u>1st antibody solution</u>	(20 μ l/well)
1 st Antibody	1/50 ~ 1/200
2.5% BSA/PBS	20 μ l

☞ サンプル数に応じてまとめて調製すると良い。

11. タッパーの中にキムワイプを数枚敷き込み、イオン交換水を振りかけて湿らせておく。そのなかに抗体溶液を滴下した 24 well プレートを手を洗ったまま静置し、室温にて 60 min 反応させる。
12. 0.05% Tween20/PBS 500 μ l/well (RT 5 min shake \times 3) にて洗浄する。
13. 2nd antibody solution 20 μ l/well (RT 60 min) (1 次抗体のときと同様に操作を行う。)
- ☞ 蛍光標識された抗体を用いているので、以下の操作は適宜アルミホイルで覆って遮光する。

<u>2nd Antibody solution</u>	(20 μ l/well)
2 nd Antibody	1/200 ~ 1/400
2.5% BSA/PBS	20 μ l

☞ サンプル数に応じてまとめて調製すると良い。

☞ 核染色を行うときには Hoechst33342 あるいは DAPI を 1/500 にて同時に添加する。

2nd Antibody

Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (H+L) conjugate highly cross-adsorbed (Molecular Probes # A-11034)

Alexa Fluor 546 goat anti-rabbit IgG (H+L) conjugate highly cross-adsorbed (Molecular Probes # A-11035)

Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (H+L) conjugate highly cross-adsorbed (Molecular Probes # A-11029)

Alexa Fluor 546 goat anti-mouse IgG (H+L) conjugate highly cross-adsorbed (Molecular Probes # A-11030)

Hoechst33342 (bisBENZIMIDE, Sigma #B-2261) 10 mM stock

☞ 膜透過性があるので生細胞を染色することが可能です。

DAPI

Alexa Fluor 350 Phalloidin (Molecular Probes # A-22281)

14. 0.05% Tween20/PBS 500 μ l/well (RT 5 min shake \times 3) にて洗浄する。

15. スライドガラス (Micro slide glass, Matsunami #S-0314 NEO 白縁磨 No.2) 上にマウント剤 Fluoromount/Plus (日本ターナー #DBS K048) を滴下する。
16. ピンセットでカバーガラスを取り出し、Milli-Q H₂O で軽くすすいだ後に、細胞が乗った面をマウント剤に接着させるようにして置く。
 - ☞ このとき気泡が入らないように注意する。
 - ☞ 余分なマウント剤はピペットマンで吸い取る。ただし除きすぎると乾燥する過程で気泡が入ります。
17. アルミホイルで遮光したのち、水平を保ちながら室温で乾燥する。
18. マウント剤が完全に乾燥したことを確認した後に、蛍光顕微鏡で観察する。
 - ☞ マウント剤が乾燥していないと、顕微鏡の対物レンズに付着するので必ずしっかりと乾燥させること。