



MatriMix (511)で包埋培養した細胞のホルマウント免疫染色

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。
※MatriMix (511)の液量が多い場合、二晩を目安に固定時間を延長して下さい。
3. 固定液を除去して、PBST (0.1% Tween-20) での 5 分間洗浄を 2 回実施する。
4. 0.1%サポニン(+)ブロッキング液^{注1}を添加して、室温・振盪条件で 2 時間から一晩かけて透過処理する。
5. 0.1%サポニン(+)ブロッキング液を除去する。
6. 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 時間から一晩かけて処理する。
※一晩での処理を推奨しています。
7. 一次抗体液を除去して、PBST (0.1% Tween-20) での 5 分間洗浄を 3 回実施する。
8. 洗浄液を除去する。
9. 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 2 時間処理する。
10. 二次抗体液を除去して、PBST (0.1% Tween-20) での 1 時間洗浄を 3 回実施する。
11. 多重染色する場合は、step 6 – step 10 の過程を繰り返す。
12. 顕微鏡観察する。
※剥がしたゲルをスライドガラスに載せて、封入剤（例：Fluoromount-G (SouthernBiotech, #0100-01 など) を滴下した後、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。