

### Ⅲ. 抗体標識

#### Ⅲ-1. 材料

- ・ 蛍光試薬 : Fluolid・Orange / DMSO ( 5 mM )
- ・ 二次抗体 A : Goat anti-rebbit IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch)  
Code Number : 111-001-003  
Lot Number : 119044 63.0 mg/mL (20 倍希釈して使用)
- ・ 二次抗体 B : Goat anti-rebbit IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch)  
Code Number : 111-005-003  
Lot Number : 118398 2.4 mg/mL
- ・ Buffer : 0.2M NaHCO<sub>3</sub> ( pH8.3 )  
1 × TBS buffer ( 20mM Tris-HCl+137mM NaCl )  
1 × TBS-T buffer ( 1 × TBS buffer+0.1%Tween20 )

#### Ⅲ-2. 標識プロトコール

- ・ 50kDa の AmiconUrtra に抗体溶液を抗体量として 500μg 計り取る
- ・ 0.2M NaHCO<sub>3</sub> を 200μL 加える
- ・ 10,000×G で 3 分間遠心する
- ・ 以上 (0.2M NaHCO<sub>3</sub> を 200μL 加え、10,000×G で 3 分間遠心する) を 3 回繰り返す
- ・ 0.2M NaHCO<sub>3</sub> を 200μL 加えてピペッティングする
- ・ Fluolid-NS / DMSO を適量加え、ピペッティングする
- ・ 37°C で 90 分間インキュベートする
- ・ 100μL の 1 × TBS-T buffer を加える
- ・ 10,000×G で 3 分間遠心する
- ・ 200μL の 1 × TBS-T buffer を加え 10,000×G で 3 分間遠心する
- ・ 上記 (1 × TBS-T buffer を加え 10,000×G で 3 分間遠心する) を 2 回繰り返す
- ・ 200μL の 1 × TBS buffer を加え 10,000×G で 3 分間遠心する
- ・ 新しいチューブにフィルター (AmiconUrtra) を逆様に入れ、10,000×G で 5 分間遠心する
- ・ 回収した溶液を量を量り低吸着チューブに移す
- ・ 全量が 200μL となるように 1 × TBS Buffer を加える。

#### Ⅲ-3. 精製

今回は、NAP カラムによるゲル濾過を実施したものと、ゲル濾過を実施し無いものの比較も行った。

- ・ NAP5 の栓を抜き、中の buffer を落とす
- ・ 上限まで 1 × TBS-T buffer を入れ、ゲルの上部が空になるまで buffer を落とす

- ・この作業を3回繰り返す、ゲル内の buffer を入れ替える
- ・Ⅲ-2 標識抗体溶液を入れる
- ・ゲルの上部が空になったら 1×TBS-T buffer を入れる
- ・すぐに滴下が始まるので、最初の9滴程度は廃棄し、残りを回収する。
- ・回収した反応液を 50kDa の AmiconUrtra に移し、10,000×G で3分間遠心濃縮する。
- ・新しいチューブにフィルター (AmiconUrtra) を逆様に入れ、10,000×G で5分間遠心する
- ・回収した溶液を量を量り低吸着チューブに移す
- ・全量が 200μL となるように 1×TBS Buffer を加える。
- ・2%の NaN<sub>3</sub> を 2μL 加える。

## VI. 免疫染色

### IV-1 : 材料

- ・Rat 十二指腸パラフィンブロック
- ・MICRO Slide Glass (Matsunami MAS-GP)
- ・脱パラフィン剤 : Xylene、EtOH (100、95、90、80、70%)
- ・洗浄液 : 1×PBS、0.1%Tween20-1×PBS
- ・Daco pen
- ・賦活化剤 : 0.1M Citric Acid Monohydrate、0.1M Trisodium Citrate
- ・ブロッキング剤 : Dako Antibody Diluent with Background Reducing Components
- ・封入剤 : 水溶性封入剤 (Dako Fluorescence Mounting Medium)  
非水溶性封入剤 (Mount Quick)
- ・一次抗体 : abcam Anti-PCNA antibody [EPR3821]ab92552

### VI-2 : 組織切片の作成

- ・ミクロトームで、ホルマリン固定、パラフィン封入した組織片を任意の厚さ(今回は 5μm)にスライスし、スライドガラス上に数滴の水を滴下した上に置く。この際折れ曲がりや重なり等があれば針等で切片を破らないように注意しながら伸ばす(本件では、一枚のスライドガラスに3乃至4枚の切片を乗せた)。
- ・表面の水滴が無くなる程度、パラフィン伸展器上に傾斜させて置く。
- ・パラフィン伸展器上に水平に置き、40°Cで一晩静置し、切片をスライドガラスに固定する。

### VI-3 : 染色

#### VI-3-1 : 脱パラフィン

- ・染色バットを用い、キシレン (I相) に浸し軽く濯いだ後、5分間浸漬する。

- ・キシレン（Ⅱ相）に浸し軽く濯いだ後、5分間浸漬する。
- ・キシレン（Ⅲ相）に浸し軽く濯いだ後、5分間浸漬する。
- ・EtOH（100%）に浸し軽く濯いだ後、5分間浸漬する。
- ・EtOH（100%）に浸し軽く濯いだ後、5分間浸漬する。
- ・EtOH（95%）に浸し軽く濯いだ後、5分間浸漬する。
- ・EtOH（90%）に浸し軽く濯いだ後、5分間浸漬する。
- ・EtOH（80%）に浸し軽く濯いだ後、5分間浸漬する。
- ・EtOH（70%）に浸し軽く濯いだ後、5分間浸漬する。
- ・水中で軽く濯ぐ（切片が水をはじかなくなることを確認する）。
- ・PBS buffer に浸漬し shaker で 10 分間振盪する。

#### VI-3-2：抗原の賦活化

- ・スライドガラスを染色用トレイにセットし、賦活化剤（0.1M Citric Acid Monohydrate 4.5mL+0.1M Trisodium Citrate 20.5mL）を水 225mL と混合し、全量を 250mL に調整した溶液に浸し、80~90℃で 20 分間加熱する（本件では、家庭用電子レンジを用いたため、沸騰し始めたら加熱を止め、90 秒後に再度加熱し、沸騰し始めたら止める作業を 15 分間繰り返す）。
- ・加熱終了後 15 分間放冷する。
- ・容器ごと水に浸し 15 分間冷却する。
- ・スライドガラスを PBS buffer に浸し、shaker で 10 分間振盪し、クエン酸を洗い落とす。

#### VI-3-3：ブロッキング

- ・PBS buffer からスライドガラスを取り出し、軽く水分を落とし、切片をそれぞれ（今回は 1 枚のスライドガラス上に連続した 3 乃至 4 切片を固定）Dako pen で囲む。
- ・Dako pen で囲んだ各切片を Dako Antibody Diluent with Background Reducing Components で覆う。
- ・蓋付きの湿潤箱に、スライドガラスを裏面が湿潤箱の底部に直接触れない状態で水平に置き、shaker で 60 分間ゆっくり振盪する。
- ・0.1% Tween20-PBS buffer に浸し shaker で 5 分間洗浄する（二回行う）。

#### VI-3-4：一次抗体

- ・abcam Anti-PCNA antibody [EPR3821]ab92552 を Dako Antibody Diluent with Background Reducing Components で希釈する（500~1000 倍）。
- ・各切片を一次抗体溶液で覆う。
- ・4℃で一晩反応させる。

### VI-3-5 : 二次抗体

- ・ 標識二次抗体溶液を **Dako Antibody Diluent with Background Reducing Components** で希釈する (Alexa488 は 500 倍希釈、NS 標識体は 50 倍希釈)。
- ・ 一次抗体と反応させた切片を 0.1% Tween20-PBS buffer に浸漬し shaker 上で 10 分間洗浄する (buffer を換えて 2 回洗浄する)。
- ・ 切片上の水分 (buffer) を軽く落とし、調整した二次抗体溶液で切片を覆う。
- ・ shaker 上、室温で 60 分間インキュベートする。
- ・ PBS buffer で軽く流し(切片に直接かけない)0.1% Tween20-PBS buffer に浸漬し shaker 上で 10 分間洗浄する (buffer を換えて 2 回洗浄する)。
- ・ PBS buffer に浸漬し shaker 上で 10 分間洗浄する。

### VI-3-6 : 封入

#### ◎水溶性封入剤の場合：

余分な水分を切り、**Dako Fluorescence Mounting Medium** で切片を覆い、気泡が入らないようにカバーガラスを乗せ、四辺をストッパーで固定する。

#### ◎脱水の場合：

- ・ EtOH (70%) で軽く濯ぐ。
- ・ EtOH (80%) に浸し軽く濯ぐ。
- ・ EtOH (90%) に浸し軽く濯ぐ (2 乃至 3 回)。
- ・ EtOH (100%) に浸し軽く濯いだ後、3 分間浸漬する (2 回)。
- ・ キシレン (I 相) に浸し、3 分間浸漬する。
- ・ キシレン (II 相) に浸し、3 分間浸漬する。
- ・ **Mount Quick** で切片を覆い、気泡が入らないようにカバーガラスを乗せ、四隅をストッパーで固定する。