

【細胞の固定・保存】

細胞を入れた 10ml チューブに PBS-BSA をいっぱいまで加える。1500rpm/4C/5 min
500 μ l くらいまで捨てる。細胞を良く懸濁する。

冷やした UM-Fix 500 μ l を加えすぐに細胞を良く懸濁

UM-Fix 9ml 加え軽く懸濁 4C 15 min 1500rpm/4C/5min 上清を 100 μ l まで吸引

冷 PBS-T をいっぱいまで加える。1500rpm/4C/5min 上清を 100 μ l まで吸引

冷やした凍結保存液を 5ml 加え 1500rpm/4C/5min 上清を 100 μ l まで吸引

冷やした凍結保存液を 400 μ l 加え細胞を懸濁

少量取って細胞数計測 1 万個の細胞あたり 1 μ l になるよう凍結保存液を加える。

0.5ml チューブに分注 -80C 保存

【前処理】

凍結保存してある UM-Fix で固定した細胞液に 9 倍量の透過液を加え溶解。4C 30 min

冷 PBS-T をいっぱいまで加えた 10ml チューブに全量移す。1500rpm(430g)/4 C/5min
上清を 200 μ l まで吸引、Blocking 液をいっぱいまで加える。

1500rpm/4 C/5min 上清を 200 μ l くらいまで吸引。

1500rpm/4 C/5min ピペットで上清をできるだけ吸引

【一次抗体添加】

抗体を Can Get Signal immunostain A 液で希釈する。

(モノクローナル抗体の場合 0.5 μ g/ml 程度)

希釈した抗体液 250 μ l を加え 1ml ピペットで細胞を軽く懸濁 4C 2hr

*蛍光標識 1 次抗体のみを使用する場合は@へ

1/4 Blocking 液をいっぱいまで加え 1 回転倒混和 1500rpm/4 C/5min

上清を 200 μ l 程度まで吸引

1500rpm でスピンドウン、200 μ l までピペットできちんと吸引

【2次抗体反応】

*O*Donkey F(ab')₂ 抗マウス IgG ポリクローナル抗体 DyLight 650 標識 (500 μ g/ml)

抗体 1 μ l を加える (終濃度 2.5 μ g/ml)。

1ml ピペットで細胞を軽く懸濁 暗所で 4 C 2 hr

*2 重染色をしない場合は@へ

1/4 Blocking 液をいっぱいまで加え 1 回転倒混和 1500rpm/ 4 C/5min

上清を 200 μ l まで吸引

【多重染色】

蛍光標識モノクロー抗体を Blocking 液にて 100 μ g/ml に希釈する。

抗体液を 1 μ l 加える (最終濃度 0.5 μ g/ml)。

1ml ピペットで細胞を軽く懸濁 暗所で 4 C 2 hr

@冷 PBS-T をいっぱいまで加える。1 回転倒混和。1500rpm/ 4 C/5min

上清をできるだけ吸引 冷 PBS-T 2ml を加える。

50 μ l の 8%PFA を加える (最終濃度 0.2%)。暗所に保存。

細胞を懸濁 35 μ l のフィルターを通す。直前にボルテックス Flow Cytometer で計測

試薬

*RNase free の試薬 (赤字) は乾熱した瓶 (蓋は AC) またはディスポのチューブで保存

*DEPC-DW

DW1L に DEPC 1ml を加える。瓶に蓋をして良く振る。ふたを軽く開けてフードの中で 1 晩。AC

*10xPBS 500ml

NaCl

40g

KCl	1g
Na ₂ HPO ₄ (12 水和物)	14.5g
KH ₂ PO ₄	1g

500ml の DW に溶解 DEPC 処理

*マレイン酸 Buffer 100ml

Maleic Acid (最終 100mM)	1.16g
NaCl (最終 150mM)	0.876g

DEPC-DW で 95ml として NaOH で pH を 7.5 にあわせる。

* 5 %BSA

アルブミン 5g を 90ml のマレイン酸 Buffer に加える。スタータラー加熱しながら薬さじで激しく攪搬、ある程度溶けたら回転子で引き続き攪搬する。(あまり温度を上げすぎるとアルブミンが固まるので注意) 完全に溶解したらマレイン酸 Buffer で 100ml とする。50ml チューブで 4 C 保存。

*PBS-BSA 500ml

10xPBS	50ml
DW	445ml
5 %BSA	5ml

DEPC 処理。4 C 保存。

*UM-Fix 47.5ml

メタノール 42.5ml (終濃度 85%)
ポリエチレングリコール (分子量 300) 5ml (終濃度 10%)
50ml チューブに入れて 4 C 保存

*凍結保存液 50ml

DEPC-DW	40ml
10XPBS(DPEC 処理済)	5ml
DMSO	5ml

50ml チューブに入れて 4 C 保存。

*PBS-T 2L

NaCl	16g
KCl	0.4g
Na ₂ HPO ₄ (12 水和物)	5.8g
KH ₂ PO ₄	0.4g

DW 1900ml

DW で 2L に合わせる。500ml ずつ瓶 4 本に分注。DEPC を 500 μ l ずつ加え良く振って一晩放置。翌日 AC。冷えた時点で Tween 20 を 500 μ l ずつ加えよく振る。

*透過液 90ml

10xPBS 9ml
Triton X-100 100 μ l (終濃度 0.1%)
DEPC-DW で 90ml に

*Blocking 液 200ml

Blocking Reagent (Roche) 1g をマレイン酸 Buffer で約 10ml とする。加熱して溶解させる。DW で 180ml に合わせ、10xPBS 20ml を加える。DEPC 200 μ l 加え、蓋をきつくしめてしっかり振る。37C 1hr 振蕩、常温で ON、AC。冷えたら Tween 20 200 μ l (最終 0.1%) 加え懸濁、4 C 保存

*1/4Blocking 液 100ml

Blocking 液 25ml
PBS-T 75ml

*8%PFA- PBS 50ml

(薬さじ 1 本, 100ml ビーカー 1 個を乾熱, 回転子 1 個 をオートクレイブ)
40ml の DEPC-DW を 75C に加熱し, 乾熱した薬さじで激しく攪拌しつつパラホルムアルデヒド 4g を加える。10N NaOH 20 μ l を加えて攪拌, 回転子を入れてホイルでしっかり蓋をして透明になるまで攪拌, すぐに氷冷する。冷えたら DEPC-DW で 45ml に合わせ 10xPBS 5ml 加える DEPC-DW で 45ml に合わせ。注射器で 5 μ l のフィルターでろ過 (注射器とフィルターは DW で洗浄後、DEPC-DW でリンス、再利用)。4C 保存 (1 か月以内に使用する)