**CGRP(calcitonin gene-related peptide) に対する免疫組織化学的染色**

○準備

4％PFAで灌流固定した後に第4・5腰髄またはDRG(dorsal root ganglion)を採取し，室温で24h，4％PFAで浸漬固定した後に，順次10・20％スクロースを含むPBSに浸漬し置換を行う．試料はトラガントガムに包埋後，急速凍結をおこなう。

＜1日目＞

1. 凍結切片作成(脊髄20 µm, DRG5µm)
2. 風乾(10min)
3. 1% TritonX-100 in PBS (30min)
4. PBS洗浄(5min×3)
5. 内因性ペルオキシターゼ抑制

0.3%H2O2 メタノール(30min)

1. PBS洗浄(5min×3)
2. 5%ウシアルブミンPBSでブロッキング(30min)
3. 1次抗体反応(4℃でovernight)

品名：Anti CGRP　品番：24112　メーカー：Immunostar Inc.

希釈倍率500倍(5%ウシアルブミンPBSで希釈)

1. 2次抗体作成

品名：TEXASRED ANTI-RABBIT IgG　品番：TI-1000　メーカー：VECTOR

1. 希釈倍率500倍(5%ウシアルブミンPBSで希釈)

拡散後ラット血清を1次抗体を同量加える　(4℃でovernight)

＜2日目＞

1. PBS洗浄(5min×3)
2. 2次抗体反応(室温で1h)
3. PBS洗浄(5min×3)
4. グリセリン封入