＜硬組織（関節包）のH・E染色＞

１．切片にドライヤーの温風を当てて、パラフィンを溶かしておく。

２．脱パラフィン（3回）、親水化（100％アルコール2回）を行う。各5分。

３．水道水で洗浄

４．ヘマトキシリン液に浸漬。5分

５．流水で洗浄。30分

６．エオジン液に浸漬。5分

７．水道水で洗浄

８．脱水・透徹・封入

＜硬組織（関節包）のPicrosirius red染色＞

※Polysciences,Inc社製　Picrosirius Red Stain Kitを使用

１．切片にドライヤーの温風を当てて、パラフィンを溶かしておく。

２．脱パラフィン（3回）、親水化（100％アルコール2回）を行う。

３．純水で洗浄。

４．切片周りの余分な水分を拭き取り、疎水ペン（PAPペン）で切片を囲う。

５．Solution A（200μl/切片）を反応させる。（2分）

６．ボトルの純水で軽く流す。

７．Solution B（200μl/切片）を反応させる。シェイカーで軽く揺らす。（９0～110分）

８．Solution Bを捨て、Solution C（200μl/切片）を反応させる。2分

９．Solution Cを捨てる。

10．70％アルコールに浸せき。（45秒）

11．脱水・透徹・封入（脱水は90%アルコールから）

＜硬組織（関節包）のα‐SMA　免疫組織学的染色＞

準備

* 0.01M　PBS（2～3L）
* 0.01M　TBS-T（0.01M Tris Buffer, 0.05% Tween20　500ml程度）
* １％ Bovine Serum Albumin 50ml

・0.01M PBSにAlbumin from Bovine Serum(Sigma Aldrich)を1%の濃度で溶かしたもの（溶けにくいのであらかじめ作っておく、またアルブミンが泡立ちやすいのでスターラーでの攪拌はゆっくりと行う。）

* 0.01M　クエン酸buffer（pH6.0）

・純水100mlにクエン酸(Sigma Aldrich) 2.101g溶かしたものと、純水500mlにクエン酸ナトリウム(和光純薬）14.70g溶かしたものの混合液を作り（0.1Mクエン酸buffer）それを純水で10倍希釈したものを使用。

* ABC kit（VECTOR：VECTASTAIN Elite ABC standard kit）
* DAB kit（Thermo Scientific：Metal Enhanced DAB substrate kit）
* １次抗体（Exalpha Biologicals：Anti-Actin, α-Smooth Muscle, Mouse-Mono(a-SM1)）
* ２次抗体（VECTOR：BIOTINYLATED ANTI-Mouse IgG(H+L)）
* メタノール（和光純薬）
* 30％過酸化水素（和光純薬）

手順

**＜1日目＞**

1．切片にドライヤーの温風を当て、パラフィンを溶かす。

2．脱パラフィン（３回）、親水化（100％アルコール2回）。（各5分）

3．0.01M PBSで洗浄。（5分）

4．ビーカーに入れた0.01Mクエン酸buffer（200ml）に浸漬させ、電子レンジで加熱。

　　（1分×5回、１回ごとに適度に冷ましながら、高温になりすぎるとさせると切片が剥げるので注意）

5．0.01M PBSで洗浄。（5分×3回）

6．0.3%H２O２in methanol　に10～20分間浸漬。

　7．0.01M TBS-Tで洗浄。（5分×3回）

（1度目の洗いが終わった後にPAPペンを用い切片を囲む。その後洗いは200μl/切片で行う。）

　8．1% Bovine Serum Albumin でブロッキング。（200μl/切片、30分）

（ブロッキング中に後に使用する１次抗体を作成、1% Bovine Serum Albuminで希釈。倍率は800～1000倍が目安だが、染まり具合により要調整。）

　9．ブロッキング液を捨てる。

　10．1次抗体を載せる。室温（20～22℃分子生物学室が適温）over night（通常12時間以上）。

　11．翌日の2次抗体を作成。

　　2次抗体：1% Bovine Serum Albumin=1:200 ラット正常血清を2次抗体と同量添加

**＜2日目＞**

12．0.01M TBS-Tで洗浄。（5分×3回）

　13．２次抗体を反応させる。（200μl/切片、室温2時間）

　14．ABC混合液を作成。（使用30分前、洗浄の時間も考慮）

（ABC kitのA液とB液を1% Bovine Serum Albumin2.5mlに対し1滴ずつ添加）

　15．0.01M TBS-Tで洗浄。（5分×3回）

　16．ABC混合液を反応させる。（200μl/切片、室温１時間）

　17．0.01M TBS-Tで洗浄。（5分×3回）

　18．DAB kit を使用して発色。（100μl/切片）

　（DAB kitのDAB液とSubstrareを1:9で混合、反応時間は発色具合により調整。目安は1～2分）

　19．0.01M TBS-Tで洗浄。（5分×2回）

20．水道水で洗浄。

21．メチルグリーンで核染色。（100μl/切片、5分）

22．水道水で洗浄。

23．脱水・透徹・封入。

（メチルグリーンはアルコールで脱色してしまうので脱水は90%アルコールから手早く行う。染色する切片が多い場合は脱水以降の過程を2回に分けると良い。１回7～8枚が目安。）