**c-fos 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(20 µm)
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(室温で48h)

品名：Anti c-fos(4)　品番：sc-52　メーカー：Santa Cruz Biotechnology

希釈倍率10000倍(5%ウシアルブミンPBSで希釈)

＜2日目＞

1. PBS洗浄(5min×3)
2. 2次抗体反応(室温で1h)

品名：BIOTINYLATED ANTI-RABBIT IgG　品番：BA-1000　メーカー：VECTOR

希釈倍率500倍(5%ウシアルブミンPBSで希釈)

1. PBS洗浄(5min×3)
2. ABC液反応(室温で1h) ABCキット使用
3. PBS 1ml +A液1滴+B液1滴
4. PBS洗浄(5min×3)
5. DAB発色

0.05M Trisバッファー100ml+DAB10mg+0.3%H2O2

1. 蒸留水
2. 脱水、透徹、封入