

# Paraffin block immunofluorescence

2021.05.11. 장혜리

Paraffin slide 준비: 조직 4% PFA 에 이틀간 고정후 병리실에 맡겨서 paraffin block, slide를 얻는다.

1. Deparaffinization 과정 (jar 하나에 100ml)

xylene 3분씩 2번-> xylene:100% ethanol=1:1 3분->100% ethanol 3분 2번->95% ethanol 3분->70% ethanol 3분-> 50% ethanol 3분-> cold water 3분 2번

jar에 있는 슬라이드를 옮겨가면서 진행

2. Antigen retrieval (used for antigen detection by breaking cross-links between antigens)

유리 jar 에 sodium citrate buffer (10mM sodium citrate, 0.05% tween20, pH6) 증탕으로 미리 끓여 놓고 조직을 넣어 25분간 끓인다.

-중간에 증발하여 다시 추가로 넣어주어야 하므로 물, Buffer를 여분으로 데워준다.

-Sodium citrate buffer 는 펄펄 끓지 않고 불투명 하게 색이 바뀌는 것을 볼 수 있다.

3. 끓인 조직을 찬물에 10분간 담궈 놓는다.

4. 다코펜으로 조직주위에 원을 그린다.

5. 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 10분간 endogenous peroxidase activity를 막는다.

6. TBS with 0.025% Triton x-100 buffer 로 washing 5분씩 2번

(slide box에 슬라이드를 넣고 washing buffer 로 채워둔뒤 shaker위에 올려서 washing)

7. 1시간 blocking

blocking buffer ( 5% F BS, 0.3% Triton X-100 in PBS)

8. Blocking buffer 털고 주변 휴지로 닦기->1차 Antibody (1% BSA, 0.3% Triton X-100 in PBS, Antibody Ly6C, F4/80 1:200) (\*2개 이상mix 경우: antibody는 반드시 host 다른걸로)

형광 antibody 있을 경우 호일로 싸고 냉장고 4도씨 Incubate overnight 냉장보관

9. PBS washing 5분씩 3번

10. 2차 Antibody (antibody solution에 antibody 1:200, DAPI 1:500 둘다 넣고) 2시간 냉장 보관

11. PBS Washing 5분씩 3번

12. 다코펜 주변 물기 닦고 mounting solution (Vetasheld) 1방울->cover glass 올리기-> 핀셋으로 기포 밀어주어 없애기->냉장보관 하고 저녁에 매니큐어 칠해서 조직함 냉장보관 (차광해서)

13. 4도씨 냉장보관