VECTOR LABORATORIES 社

VECTASTAIN ABC-AP Kit 図解操作マニュアル

VECTASTAIN ABC-AP Kit を用いたパラフィン包埋切片染色法

※特に指定のない限り，操作は常温（ 20～25℃ ）で行って下さい。
※図中の製品の外観は実際のものとは異なります。

共1～共6…別紙共通操作参照　　オ1～オ5…別紙オプション操作参照

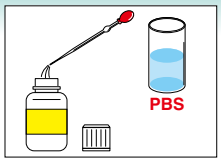
ステップ 1 切片の前処理［別紙参照］

共1 脱パラフィン ▶ 共2 水和／洗浄 ▶ オ1 抗原賦活化処理 ▶ 共3 疎水性バリアー形成／スライドガラスのマーキング ▶

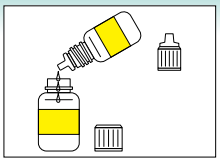
ステップ 2 正常動物血清の調製／ブロッキング処理

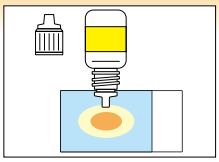
※血清は二次抗体を作製した動物（ 免疫動物 ）と同じ動物種の正常血清を用います。
※ PBS の調製方法は共4をご覧下さい。

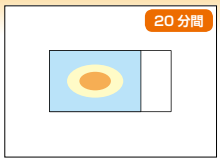
調製　　ブロッキング処理



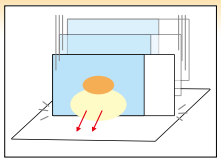
混合瓶（黄色ラベルの大瓶）に 10 ml の PBS を入れる


ブロッキング用血清ストック溶液（ 黄色ラベルの小瓶 ）を 3 滴加える


調製した正常動物血清を，切片を覆うように滴下する

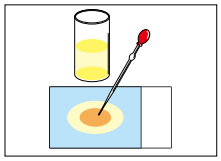


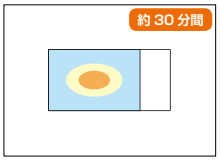
インキュベーション


ペーパータオルの上でスライドを軽く打ち付けて，血清を除去する

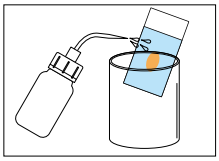
ステップ 3 一次抗体反応

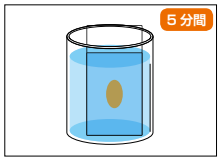
※抗体の希釈濃度，使用するバッファー，反応時間については，製品のプロトコルをご覧下さい。


適切な濃度に希釈した一次抗体を，切片を覆うように滴下する

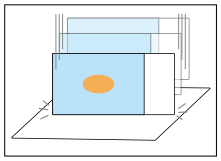


インキュベーション


PBS で洗浄する

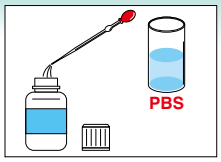


PBS 中でインキュベーション

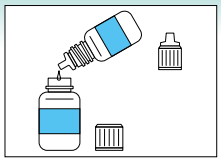

ペーパータオルの上でスライドを軽く打ち付けて，PBS を除去する

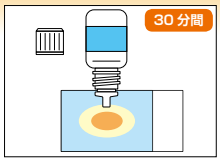
ステップ 4 ビオチン標識二次抗体の調製／反応

調製　　反応

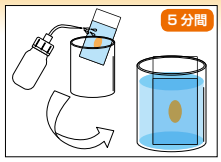


混合瓶（青色ラベルの大瓶）に 10 ml の PBS を入れる

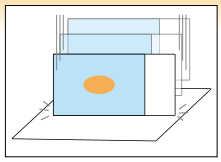

ビオチン標識二次抗体ストック溶液（ 青色ラベルの小瓶 ）を 1 滴加える



調製したビオチン標識二次抗体を，切片を覆うように滴下し，インキュベーション



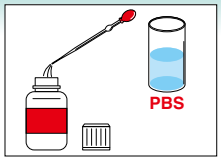
PBS で洗浄後，PBS 中でインキュベーション


ペーパータオルの上でスライドを軽く打ち付けて，PBS を除去する

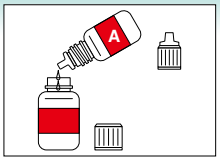
ステップ 5 VECTASTAIN ABC-AP 試薬の調製／反応

VECTASTAIN ABC-AP 試薬の調製は，使用する 30 分前に行って下さい。

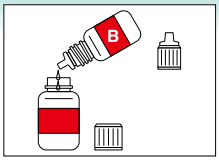
調製　　反応



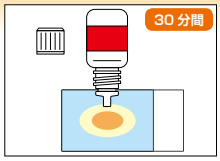
混合瓶（赤色ラベルの大瓶）に 10 ml の PBS を入れる



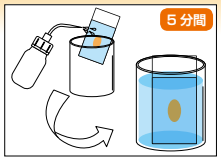
試薬 A（赤色ラベルの小瓶）を 2 滴加える



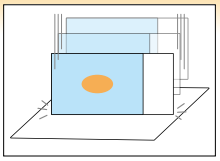
試薬 B（赤色ラベルの小瓶）を 2 滴加えて直ちに混合する



調製した VECTASIATIN ABC-AP 試薬を，切片を覆うように滴下し，インキュベーション



PBS で洗浄後，PBS 中でインキュベーション

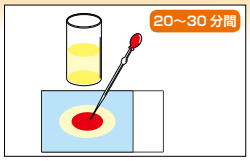

ペーパータオルの上でスライドを軽く打ち付けて，PBS を除去する

ステップ 6 酵素基質溶液の調製／反応

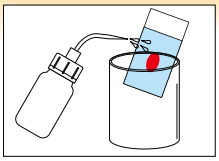
※酵素基質は VECTASTAIN ABC-AP Kit には含まれておりません。別途ご用意下さい。
※調製方法については共5をご覧下さい。

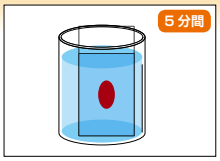
調製　　反応

共5 酵素基質溶液の調製 ▶ オ2 内在性酵素のブロッキング処理 ▶



調製した酵素基質溶液を，切片を覆うように滴下し，インキュベーション


PBS で洗浄する



蒸留水中でインキュベーション

ステップ 7 切片の後処理［別紙参照］

オ3 対比染色 ▶ オ4 脱水処理 ▶ オ5 透徹処理 ▶ 共6 封入 ▶ 乾燥させる ▶ 観察・保管する

日本総代理店　フナコシ株式会社

製品内容や操作方法についての詳細は，当社テクニカルサポート（ 下記参照 ）までお問合せ下さい。
試薬に関して：Tel. 03-5684-1620　Fax 03-5684-1775　e-mail：reagent@funakoshi.co.jp

Z1-U06T-01（ 2011.06 ）

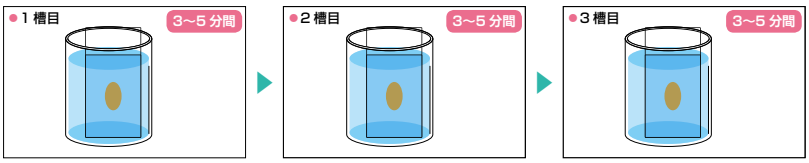
VECTOR LABORATORIES 社

VECTASTAIN ABC-AP Kit 図解操作マニュアル［別紙］

パラフィン包埋切片染色法　共通操作

共 1 脱パラフィン

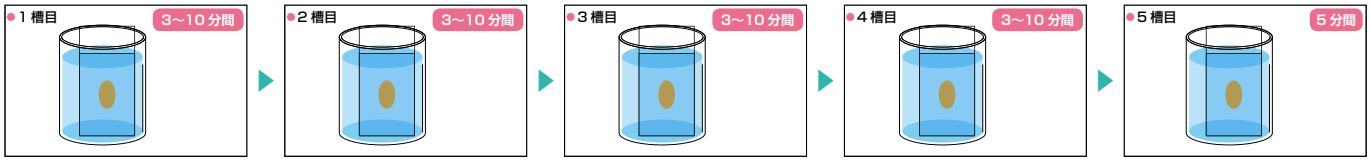
※キシレンまたはキシレン代替品で脱パラフィン化します。
※キシレン代替品の場合は製品のプロトコルに従って下さい。
※脱パラフィンには様々な方法があります。右記の処理時間は一例です。



キシレンまたはキシレン代替品に浸す　キシレンまたはキシレン代替品に浸す　キシレンまたはキシレン代替品に浸す

共 2 水和／洗浄

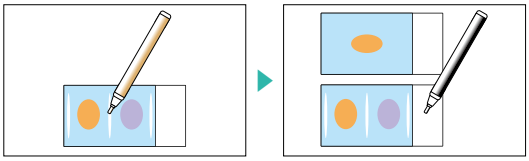
※アルコール濃度を段階的に下げて水和します。
※水和には様々な方法があります。以下の処理濃度および時間は一例です。



100%アルコールに浸す　100%アルコールに浸す　95%アルコールに浸す　95%アルコールに浸す　蒸留水に浸す

共 3 疎水性バリアー形成／スライドガラスのマーキング

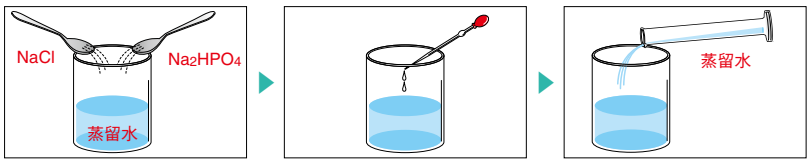
※同一スライドガラス上で二種類の切片を染色する場合，ImmEdge Pen（ # H-4000 ）で境界線を作ることにより，染色液等の混入を防ぐことができます。
※スライドガラスのマーキングには ImmPrint Permanent Marking Pen（ # H-6100 ）をご使用下さい。



必要に応じて ImmEdge Pen で疎水性バリアーを形成する　ImmPrint Permanent Marking Pen でスライドガラスの書き込み可能領域に必要事項を記入する

共 4 PBS の調製方法

※右記の調製方法は一例です。

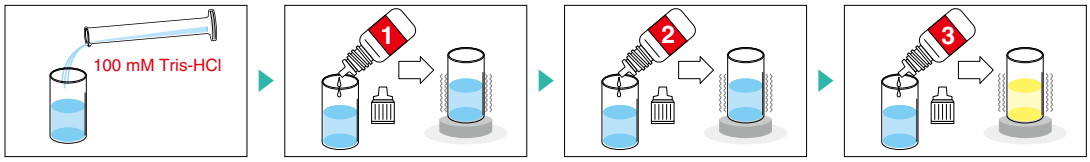


蒸留水 950 ml に Na_2HPO_4 1.42 g と NaCl 8.75 g を溶解する　リン酸で pH7.5 に調整する　蒸留水で終量を 1,000 ml にする

共 5 酵素基質溶液の調製方法

100 mM Tris-HCl の推奨 pH は基質の種類により異なります。下表をご確認の上，調製して下さい。

基質	呈色	100 mM Tris-HCl の推奨 pH	封入剤	キャップの色	ラベルの色	商品コード
Ⅰ (VECTOR Red)	赤	8.2 ～ 8.5	非水溶性／水溶性	白	赤	# SK-5100
Ⅱ (VECTOR Black)	茶／黒	9.5	非水溶性	茶	茶	# SK-5200
Ⅲ (VECTOR Blue)	青	8.2	非水溶性／水溶性	青	青	# SK-5300
Ⅳ (BCIP/NBT)	青／紫	9.5	非水溶性／水溶性	紫	紫	# SK-5400

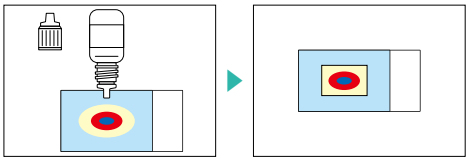


試験管などに 100 mM Tris-HCl（pH は上表参照）5.0 ml を入れる　試薬 1 を 2 滴加えてボルテックスでよく混ぜる　試薬 2 を 2 滴加えてボルテックスでよく混ぜる　試薬 3 を 2 滴加えてボルテックスでよく混ぜる

※左記のキャップ／ラベルの色は VECTER Red（ # SK-5100 ）のイメージ色です。

共 6 封入

※永久封入をする場合は，オ 4 脱水，オ 5 透徹の処理を先に行って下さい。
※永久封入をする場合は，非水溶性封入剤 VectaMount Permanent Mounting Medium（ # H-5000 ）をご使用下さい。
※水溶性封入剤 VectaMount AQ Aqueous Mounting Medium（ # H-5501 ）も使用方法は同じですが，永久封入はできません（ 約 1 年間保存可能 ）。
※ VECTOR Red（ # SK-5100 ），VECTOR Blue（ # SK-5300 ），BCIP/NBT（ # SK-5400 ）は非水溶性／水溶性封入剤のいずれも使用可能です。
※ VECTOR Black（ # SK-5200 ）は非水溶性封入剤でのみ封入できます。



封入剤を，切片を覆うように滴下する　カバーガラスで覆う

日本総代理店　フナコシ株式会社

製品内容や操作方法についての詳細は，当社テクニカルサポート（ 下記参照 ）までお問合せ下さい。
試薬に関して：Tel. 03-5684-1620　Fax 03-5684-1775　e-mail：reagent@funakoshi.co.jp

Z1-U06T-01（ 2011.06 ）

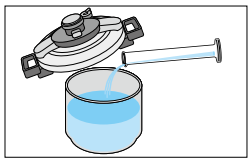
VECTOR LABORATORIES 社

VECTASTAIN ABC-AP Kit 図解操作マニュアル［別紙］

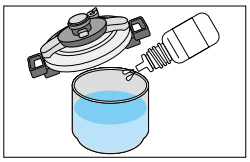
パラフィン包埋切片染色法　オプション操作

オ 1 抗原賦活化処理

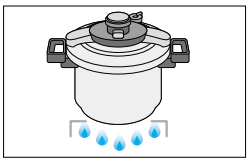
※抗原や抗体の性質により，必要に応じて抗原賦活化処理を行います。
※抗原賦活化処理には様々な方法があります。以下の方法は一例です。
※以下は Antigen Unmasking Solution（＃H-3300，＃H-3301）の使用例です。圧力鍋以外の高温賦活化方法にも対応しています。



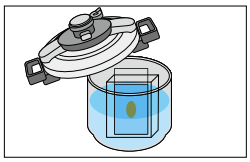
圧力鍋に 1,500 ml 程度の蒸留水を入れる
圧力鍋はステンレス製で容量４L 以上を推奨します



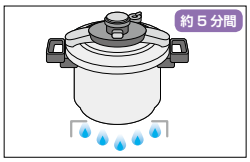
Antigen Unmasking Solution を圧力鍋に 15 ml 加える
Antigen Unmasking Solution は開栓前によく振って下さい



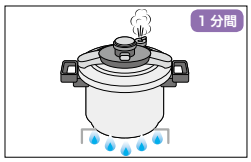
圧力鍋の蓋をして，沸騰するまで加熱する
この時点で蓋をロックする必要はありません



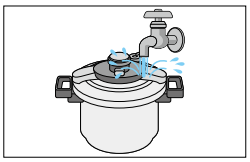
金属製ラックにスライドを置き，圧力鍋に入れる
スライドが Antigen Unmasking Solution に浸るようにして下さい



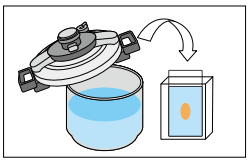
圧力鍋の蓋をしてロックし，安全ロックピンが上がるまで加熱する
安全ロックピンは製品により名称が異なります



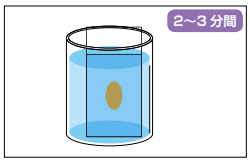
蒸気が上がった時点をスタート時間とし，１分後に火を止める



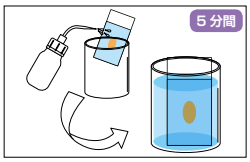
圧力鍋をシンクに移動し，蓋に冷水をかけて急冷する
蓋のロックは外さないで下さい
高温に注意して下さい



安全ロックピンが下がったことを確認し，ロックを外して蓋を開け，スライドを取り出す
熱い蒸気が立ち上がります
高温に注意して下さい



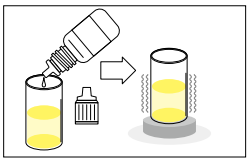
蒸留水に浸す



PBS で洗浄後，PBS 中でインキュベーション

オ 2 内在性酵素のブロッキング処理

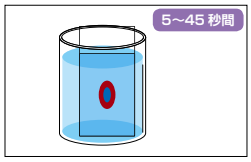
※内在性酵素（アルカリホスファターゼ）の影響が考えられる組織の場合は，ブロッキング処理を行います。
※ブロッキング処理には様々な方法があります。以下はレバミソール（# SP-5000）の使用例です。
　詳細は『VECTASTAIN ABC システム実験マニュアル（第６版）』p.53 をご覧下さい。



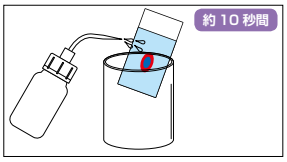
調製した酵素基質溶液に，レバミソールを１滴加えてボルテックスでよく混ぜる

オ 3 対比染色

※様々な対比染色（核染色）液があります。必要に応じて行って下さい。
※詳細は各対比染色液のプロトコルおよび『VECTASTAIN ABC システム実験マニュアル（第６版）』p.94 をご覧下さい。
※以下は VECTOR Hematoxylin QS（＃H-3404）の使用例です。



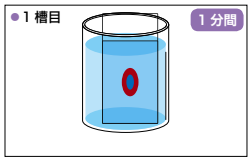
Hematoxylin QS に浸す



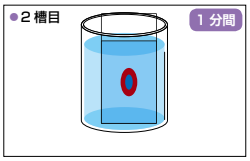
洗浄水の色が無色になるまで蒸留水で洗浄する

オ 4 脱水処理

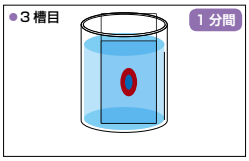
※非水溶性封入剤で封入する場合は，脱水およびオ５の透徹処理を行って下さい。水溶性封入剤の場合は不要です。
※以下は VECTOR Red（＃SK-5100），VECTOR Black（＃SK-5200），VECTOR Blue（＃SK-5300），BCIP/NBT（＃SK-5400）用の脱水方法の一例です。
※各処理時間は切片の厚みに応じて，15 秒～３分の間で調節して下さい。



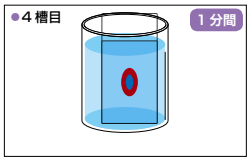
95%エタノールに浸す



95%エタノールに浸す



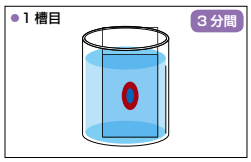
100%エタノールに浸す



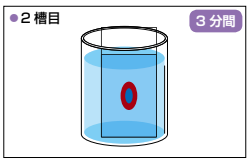
100%エタノールに浸す

オ 5 透徹処理

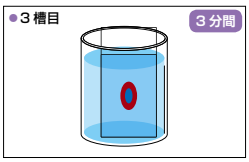
※オ４の脱水処理に引き続いて行います。
※各処理時間は切片の厚みに応じて，３～５分の間で調節して下さい。
※ VECTOR Blue（＃SK-5300）にはキシレンは使用できません。キシレン代替品をご使用下さい。



キシレンまたはキシレン代替品に浸す



キシレンまたはキシレン代替品に浸す



キシレンまたはキシレン代替品に浸す

日本総代理店　フナコシ株式会社
製品内容や操作方法についての詳細は，当社テクニカルサポート（下記参照）までお問合せ下さい。
試薬に関して：Tel. 03-5684-1620　Fax 03-5684-1775　e-mail：reagent@funakoshi.co.jp

Z1-U06T-01（2011.06）