

# 簡易

# 免疫染色

# 図解マニュアル

1 準備するもの

5 抗原抗体反応

2 前処理

5 基質反応

3 疎水性バリア形成

7 脱水•透徹•封入

4 ブロッキング

参考: 本マニュアルで使用した製品

## 本プロトコールは一例です。

ご使用される試薬のデータシートを必ずご確認下さい。 インキュベートや洗浄の時間はご使用の抗体, 基質などにより適宜調整が必要です。



- □ 組織切片
- □ 賦活化溶液
- □ 疎水性バリアペン
- □ ブロッキング試薬
- □ 一次抗体
- □ 二次抗体ポリマー試薬
- 🔲 基質

- □ 封入剤
- □ キシレン または

キシレン代替品

- □ 抗原賦活化装置
- □ 洗瓶
- PBS
- □ 蒸留水

- □ピペット
- □ チップ/チューブ
- □ カバーガラス
- □ 100% / 95% / 70% EtOH
- □ 染色バット

□ 染色かご





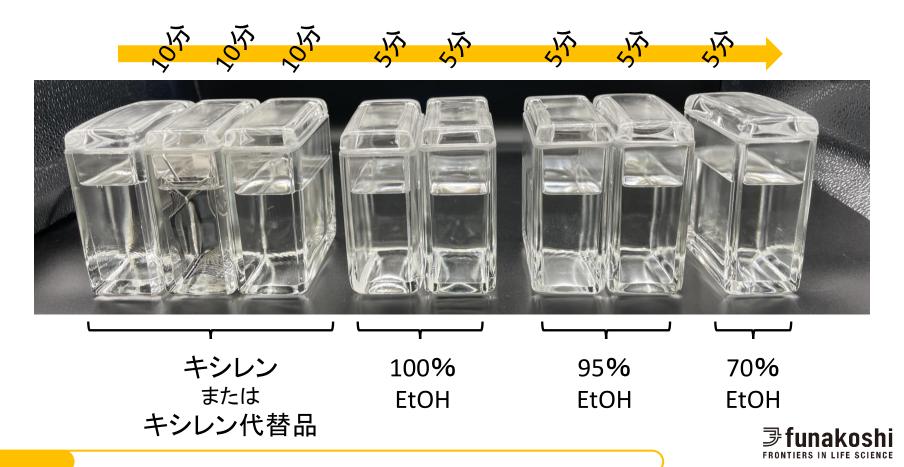
#### 前処理①



かごを移し替える際は溶液を持ち 込まないように液を良く切ること

脱パラフィン・親水処理

キシレン、EtOHを入れた染色バットを用意する。 切片を染色かごにセットし、順に脱パラフィン・親水処理を行う。



# 2 前処理②

洗浄 PBSで5分以上洗浄する。



2**~**3回必ず じゃぶじゃぶ!





5分以上浸した後, 染色かごを傾けて水切り





#### 前処理③

抗原賦活化90℃で15~30分間賦活化



賦活化溶液が指定温度になる よう前もって準備しておく



やけどに注意!



賦活化後は冷ましてから洗浄













### 2 前処理④

※抗原賦活化はウォーターバスで行うことも可能



水槽が高温のため、水位が下がっていないか注意する





#### 2

# 前処理⑤

洗浄 PBSで5分以上洗浄する。



2~3回必ず じゃぶじゃぶ!





5分以上浸した後, 染色かごを傾けて水切り





#### 疎水性バリア形成



ImmEdge Penをよく振ってから 切片の周囲に線を引き、疎水 性バリアを形成する。



液が出てこないときは, ペン先にしみるまで 押し下げてみる



#### 4 ブロッキング(1)



内在性酵素のブロッキング BLOXALLを切片に滴下する 10分間インキュベート 蒸留水の入った洗瓶で洗浄



# 4 ブロッキング②



乾燥防止のため必要に応じて湿潤箱を使用する





# 4 ブロッキング③

洗浄 PBSで5分以上洗浄する。



プTIPS 2~3回必ず じゃぶじゃぶ!



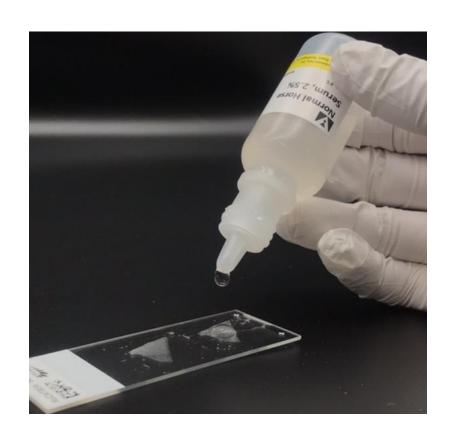


5分以上浸した後, 染色かごを傾けて水切り





### 4 ブロッキング(4)



正常動物血清でブロッキング Normal Serum を切片に滴下し 20分間インキュベートする Normal Serum を除去する



乾燥防止のため必要に 応じて湿潤箱を使用する



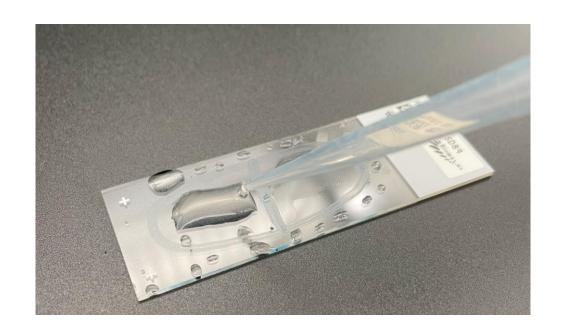
#### 抗原抗体反応①



乾燥防止のため必要に 応じて湿潤箱を使用する

一次抗体

一次抗体を切片に滴下してインキュベート 室温,60分間 または 4°C, 一晩





#### 抗原抗体反応②

洗浄 PBSで5分以上洗浄する。



2~3回必ず じゃぶじゃぶ!





5分以上浸した後, 染色かごを傾けて水切り





#### 抗原抗体反応③



二次抗体ポリマー試薬ImmPRESSを滴下する↓30分間インキュベート



乾燥防止のため必要に 応じて湿潤箱を使用する



#### 5

#### 抗原抗体反応④

洗浄 PBSで5分以上洗浄する。



2~3回必ず じゃぶじゃぶ!



5分以上浸した後, 染色かごを傾けて水切り







※洗浄の間に酵素基質溶液(次ページ)を準備する



#### 基質反応①

酵素基質溶液の準備

下記をよく混合する









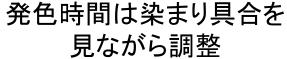
ImmPACT DAB Reagent 1 (1滴)



#### 6 基質反応②

反応
準備した酵素基質溶液を滴下し、数分間インキュベート
→
蒸留水で洗浄する



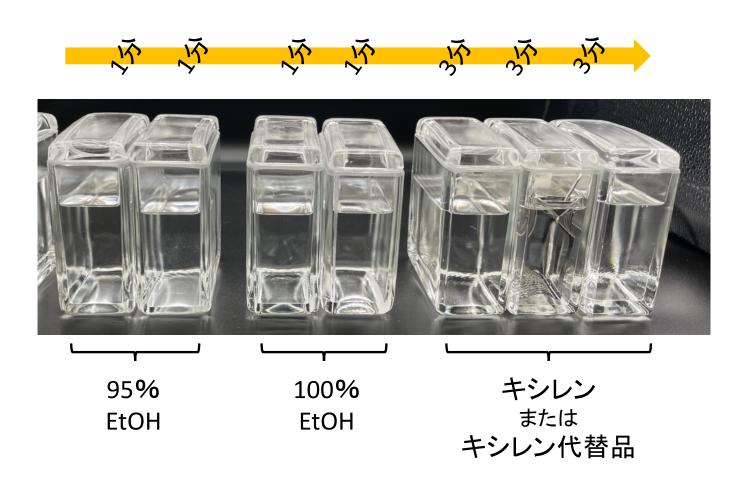




※必要に応じて対比染色を行う

#### 7 脱水•透徹•封入①

・脱水・透徹





#### 脱水•透徹•封入②



封入封入剤を滴下する。

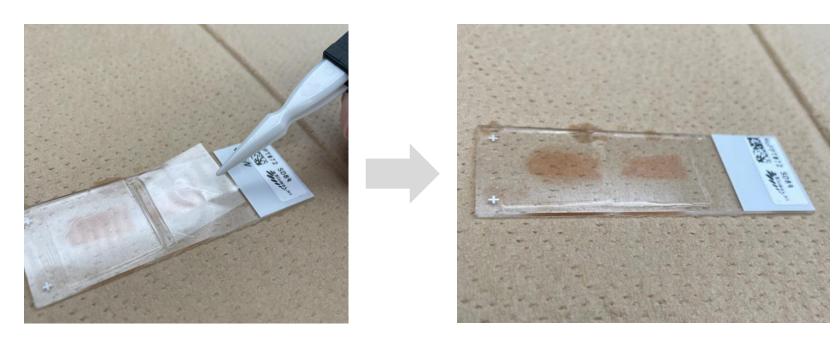


基質(水溶性, 非水溶性) によって使用する封入剤を 変えること



#### 脱水•透徹•封入③

#### カバーガラスをのせる





カバーガラスをゆっくり傾けながらのせると気泡が入りにくい



固まらない封入剤を使用した後はカバーガラス周囲をシールする



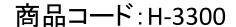
#### 参考: 本マニュアルで使用している製品

※<u>リンク</u>をクリックすると製品詳細をご覧いただけます

- □ 組織切片
- □ 賦活化溶液
- □ 疎水性バリアペン
- ロブロッキング試薬
- 口 一次抗体
- □ 二次抗体ポリマー試薬
- □ 基質



Antigen Unmasking Solution









#### 参考: 本マニュアルで使用している製品

※<u>リンク</u>をクリックすると製品詳細をご覧いただけます

- □ 組織切片
- □ 賦活化溶液
- ロ 疎水性バリアペン
- □ ブロッキング試薬
- 口 一次抗体
- □ 二次抗体ポリマー試薬
- □ 基質 ₩

酵素基質

商品コード: SK-4105



商品コード: SP-6000





ImmPRESS Reagent







#### 参考: 本マニュアルで使用している製品

※<u>リンク</u>をクリックすると製品詳細をご覧いただけます



VectaMount Permanent

**Mounting Medium** 

商品コード: H-5000



□ 封入剤

ロ キシレン または

キシレン代替品

□ 抗原賦活化装置



**G-NOX** 

商品コード: H-5000





商品コード: DC2012-UPT

