

# VECTOR LABORATORIES 社

## ABC 染色法／酵素マイクロポリマー染色法

### 1. ABC システム選択ガイド

#### はじめに

アビジンは、卵白中に存在する分子量約 68 kDa の塩基性糖タンパク質で、低分子ビタミンであるビオチンに対して極めて強い親和性（親和定数： $>10^{15} \text{ M}^{-1}$ ）を示します。アビジンとビオチンの強い親和性と特異性を利用した、様々なシステムが考案され、“アビジン・ビオチンシステム”と名付けられました。このシステムは生体構造や機能の様々な研究に利用されています。

タンパク質一分子には多数のビオチン分子が共有結合できるため、ビオチン標識タンパク質は複数のアビジンと結合することができます。また、ビオチン標識を温和な条件で行うと、タンパク質の生理活性が損われません。ビオチン標識抗体、レクチン、核酸プローブを用いれば、それぞれ抗原、糖複合体、核酸の検出に極めて有用です。

#### VECTASTAIN ABC 法とは？

組織学的に重要な抗原や、目的分子の局在を確認する方法として、免疫ペルオキシダーゼ法が、Su-Ming Hsu により開発されました。この方法は一次抗体、ビオチン標識二次抗体、およびあらかじめ調製したアビジン-ビオチン標識酵素複合体 (Avidin : Biotinylated Enzyme Complex) を用いるため、“ABC”法と名付けられました。

アビジンとビオチンの極めて強い結合は実質上不可逆的です。アビジンには四つのビオチン結合部位があります。一方、酵素を含むほとんどのタンパク質は、数分子のビオチンと結合することができます。これらの特性によって、アビジンとビオチン標識酵素の間には、巨大分子複合体 (ABC) が形成されます。

VECTOR 社ではこの原理を応用した免疫染色試薬を、キット化して提供しています。

VECTOR 社の VECTASTAIN ABC キットは、アビジン DH\* とビオチン標識酵素（ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、またはグルコースオキシダーゼ）から成り、免疫組織化学染色およびその他の用途に最適な複合体を形成するよう、特別に調製されています。アビジン DH-ビオチン標識酵素複合体の構造はまだ完全には解明されていませんが、多くのビオチン標識酵素分子がアビジンを介してクロスリンクし、三次元的配列を形成していると考えられています。複合体は少なくとも 1 個のビオチン結合部位を有しています。複合体はアビジン DH とビオチン標識酵素をバッファー中で混合するだけで形成され、形成後は数時間安定です。

**\*アビジン DH は VECTASTAIN ABC キット用に特別に調製された製品です。単品では販売していません。**

—参考文献—

Hsu, S. M., Raine, L., Fanger, H., *Am. J. Clin. Pathol.*, **75**, 734~738 (1981).

Hsu, S. M., Raine, L., Fanger, H., *J. Histochem. Cytochem.*, **29**, 577~580 (1981).

#### VECTASTAIN ABC 法の使用法

1. 目的の抗原に対応する一次抗体を組織切片と反応させます（例：腫瘍関連抗原に対するウサギ抗体）。
2. ビオチン標識二次抗体（この例の場合：ビオチン標識抗ウサギ IgG 抗体）を加えると、一次抗体・二次抗体・ビオチンの複合体が形成されます。
3. アビジン-ビオチン標識酵素の巨大分子複合体 (ABC) を加えてビオチン標識二次抗体と結合させます。
4. 最後に酵素基質溶液と反応させて、発色させることにより、組織切片上の抗原の存在部位を確認できます。

#### VECTASTAIN ABC キットの概略図 ～免疫組織化学～

- 
1. 内在性酵素活性を不活化する。
  2. 二次抗体を調製した動物種の正常血清を滴下し、一次抗体の非特異的結合をブロックする。
  3. 一次抗体を滴下する。
  4. ビオチン標識二次抗体を滴下する。
  5. VECTASTAIN ABC 試薬（アビジン-ビオチン標識酵素複合体）を滴下する。
  6. 酵素基質溶液を滴下する。

- = 抗原  
● = ビオチン  
■ = 抗体
- × = 内在性酵素活性除去剤  
□ = 正常血清  
■ = アビジン-ビオチン標識酵素複合体

※詳細は、図解操作マニュアルをご覧ください (p.43 参照)。

## キットと関連製品の種類

| VECTASTAIN キット                    | 酵 素                                | 染色枚数の目安                                  |  |
|-----------------------------------|------------------------------------|--|--|
| ABC                               | ペルオキシダーゼ (HRP)                     | 切片：1,000~2,000 枚                         |  |
| <i>Elite</i> ABC                  | ペルオキシダーゼ (HRP)                     | 切片：500~1,000 枚                           |  |
| Universal <i>Elite</i> ABC        | ペルオキシダーゼ (HRP)                     | 切片：500~1,000 枚                           |  |
| R.T.U. Universal <i>Elite</i> ABC | ペルオキシダーゼ (HRP)                     | 切片：500~1,000 枚                           |  |
| ABC-AP                            | アルカリホスファターゼ (AP)                   | 切片：1,000~2,000 枚                         |  |
| Universal ABC - AP                | アルカリホスファターゼ (AP)                   | 切片：500~1,000 枚                           |  |
| Universal <i>Quick</i>            | ペルオキシダーゼ (HRP)                     | 切片：250~500 枚                             |  |
| R.T.U. Universal <i>Quick</i>     | ペルオキシダーゼ (HRP)                     | 切片：250~500 枚                             |  |
| ImmPRESS (p.32)                   | ペルオキシダーゼ (HRP)<br>アルカリホスファターゼ (AP) | 切片：75~150 枚 (15 ml)<br>250~500 枚 (50 ml) |  |

## 各検出系の比較

| 検出系                               | 酵 素        | 感 度   | アッセイのコスト |  |
|-----------------------------------|------------|-------|----------|--|
| ImmPRESS                          | HRP または AP | ●●●●● | ●●●      |  |
| <i>Elite</i> ABC                  | HRP        | ●●●●● | ●●       |  |
| R.T.U. Universal <i>Elite</i> ABC | HRP        | ●●●●● | ●●       |  |
| Universal <i>Quick</i> ABC        | HRP        | ●●●●● | ●●       |  |
| R.T.U. Universal <i>Quick</i> ABC | HRP        | ●●●●● | ●●       |  |
| ABC                               | HRP        | ●●●   | ●        |  |
| ABC-AP                            | AP         | ●●●●● | ●        |  |
| Mouse on Mouse (M.O.M.)           | HRP        | ●●●   | ●●●      |  |
| ImmPRESS Mouse on Mouse (M.O.M.)  | HRP        | ●●●   | ●●●      |  |
| 酵素標識アビジン/ストレプトアビジン                | HRP または AP | ●●●   | ●        |  |
| R.T.U. HRP 標識アビジン/ストレプトアビジン       | HRP        | ●●●   | ●        |  |
| 酵素標識二次抗体                          | HRP または AP | ●●    | ●        |  |

VECTASTAIN ABC キットの名称は、広義にはアビジン-ビオチン標識酵素またはストレプトアビジン-ビオチン標識酵素検出法による 5 種類の酵素検出キット (ABC, *Elite* ABC, ABC-AP, Universal *Quick*) の総称として用い、狭義には、ABC ペルオキシダーゼキット (ABC-PO) を示します。

## ●各キットの特長

**VECTASTAIN ABC (ペルオキシダーゼ) キット**

最初に開発された製品で、最も広く使われています。抗原の量が一定以上存在し、多数の切片を染色したい場合や、一次抗体が安価な場合などに有用です。

**VECTASTAIN *Elite* ABC (ペルオキシダーゼ) キット**

VECTASTAIN ABC (ペルオキシダーゼ) キットを改良した製品で、染色感度が 5~10 倍高く、バックグラウン

| 特長  | キット内容   | 適する条件                                       |
|---|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>・アビジン-ビオチン標識酵素複合体 (ABC) を用いた検出法</li> <li>・バックグラウンドが低く、高感度</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>・ブロッキング用血清</li> <li>・ビオチン標識アフィニティ精製二次抗体</li> <li>・試薬 A ● 試薬 B</li> </ul>                   | 多数の切片を染色する場合、一次抗体が安価な場合                     |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>・アビジン-ビオチン標識酵素複合体 (ABC) を用いた検出法</li> <li>・ABC キットを改良したもので、感度が高く (約 5 倍)、低バックグラウンドで、シグナルの増幅が大きい</li> <li>・ABC キットよりも短時間で染色可能</li> </ul>                             |   | 抗原濃度が低い場合、厚い切片、神経組織、一次抗体が微量の場合              |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>・ABC ABC キットと同性能を有し、更にマウスとウサギ由来の一次抗体に共通して使用可能</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>・ブロッキング用ウマ血清</li> <li>・ビオチン標識アフィニティ精製ユニバーサル二次抗体</li> <li>・試薬 A ● 試薬 B</li> </ul>           |   |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>・Universal ABC ABC キットとキット内容は同じだが、あらかじめ混合希釈/安定化済みの試薬キット</li> </ul>   |   |   |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>・アビジン-ビオチン標識酵素複合体 (ABC) を用いた検出法</li> <li>・バックグラウンドが低く、非常に高感度</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>・ブロッキング用血清</li> <li>・ビオチン標識アフィニティ精製二次抗体</li> <li>・試薬 A ● 試薬 B</li> </ul>                   | 内在性のペルオキシダーゼ活性が高い組織を染色する場合                  |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>・ABC-AP キットと同性能を有し、更にマウスとウサギ由来の一次抗体に共通して使用可能</li> </ul>  |   | 細胞の形態的観察を行う場合 (固定組織では内在性のアルカリホスファターゼの影響はない) |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>・ストレプトアビジンとペルオキシダーゼの複合体をあらかじめ形成させた検出法</li> <li>・他の検出法に比べ簡便・短時間で結果を得ることができる</li> <li>・複数の由来動物種の一次抗体を検出可能</li> <li>・二次抗体はマウス・ウサギ・ラット・ヤギ・ヒツジ・ウシの IgG を認識可能</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>・ブロッキング用血清 (ウマ)</li> <li>・ビオチン標識ユニバーサル二次抗体 (ウマ)</li> <li>・ストレプトアビジン-ペルオキシダーゼ複合体</li> </ul> |   |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>・Universal Quick キットとキット内容は同じだが、あらかじめ混合希釈/安定化済みの試薬キット</li> </ul>   |   |   |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>・酵素マイクロポリマーを用いた検出法</li> <li>・非特異的結合が低く抑えられる</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>・ImmPRESS Reagent</li> <li>・ブロッキング用血清 (ウマ)</li> </ul>                                      |   |

|  | ビオチンフリー | ポリマー系 | マウス組織に抗マウス一次抗体を使用 | Ready-to-use | 免疫染色のステップ数 |
|--|---------|-------|-------------------|--------------|------------|
|  | ●       | ●     |                   | ●            | 1          |
|  |         |       |                   |              | 2          |
|  |         |       |                   | ●            | 2          |
|  |         |       |                   | ●            | 2          |
|  |         |       |                   | ●            | 2          |
|  |         |       | ●                 |              | 2          |
|  | ●       | ●     | ●                 | ●            | 1          |
|  |         |       |                   |              | 2          |
|  |         |       |                   | ●            | 2          |
|  | ●       |       |                   |              | 1          |

ドが低いという特長があります。キットに含まれるアビジン-ビオチン標識ペルオキシダーゼ複合体は、サイズが小さく均一で活性が高いため、組織切片中によく拡散し、ビオチン標識ターゲットと数多く結合します。抗原濃度が低い場合や、厚い切片、神経組織、一次抗体が微量しか手に入らない場合などに有用です。また、染色時間も短縮できます。

**VECTASTAIN ABC-AP キット**

非常に高感度ですが、一般的に染色密度がペルオキシダーゼ反応生成物よりも低いため、染色した細胞の形態的観察が重要な場合に適しています。内在性のアルカリホスファターゼは、通常の固定組織の場合は特に問題になりません。

## VECTASTAIN Universal Quick キット

あらかじめストレプトアビジンとペルオキシダーゼの複合体を形成してあるため、他の酵素検出システムに比べ、簡便に短時間で染色結果が得られます。ビオチン標識二次抗体は、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ウシのIgGを共通に認識できます。

※VECTASTAIN スタンダードキットには試薬 A と試薬 B のみが含まれ、ブロッキング用血清とビオチン標識抗体は含まれていません。

### ●キットの選択

用いる一次抗体を作製した動物種をもとに、ABCキットの種類を選択して下さい。例えばウサギで作製した一次抗体を用いる場合は、VECTASTAIN ABC “Rabbit IgG” キットを選択します。一次抗体の動物種に対応するABCキットがない場合、またはキットに含まれる抗体の特異性が使用目的に適さない場合は、使用目的にあったビオチン標識アフィニティ精製抗体を別途ご用意の上、VECTASTAIN ABC スタンダードキットと組み合わせてお使い下さい。

例えば一次抗体（または抗原）がヒトIgAの場合、ビオチン標識抗ヒトIgA抗体とVECTASTAIN ABC スタンダードキットを組み合わせ使用します。ブロッキング用血清も別売品があります。

染色する切片が一次抗体を作製した動物種と同じ場合は、ビオチン標識二次抗体が組織に内在するイムノグロブリンと結合し、バックグラウンドが高くなることがあります。このような場合には、一次抗体をビオチン標識しVECTASTAIN ABC スタンダードキットと組み合わせ使用します。またマウス組織の抗原をマウス由来の一次抗体を用いて染色する場合には、Mouse on Mouse (M.O.M.) Immunodetection キット (p.28 参照) をご使用下さい。

### ●基質キット (p.38 参照)

ペルオキシダーゼ、およびアルカリホスファターゼシステムに使用する非常に高い感度と優れた染色性を示す各種基質キットがあります。各キットには、便利な滴下瓶に入ったストック溶液と、使用説明書が入っています。

## VECTASTAIN ABC キットの選択

| 実験条件                               | 最適な ABC キット   |
|------------------------------------|---|
| ウサギで作製した一次抗体を用いる場合                 | VECTASTAIN ABC “Rabbit IgG” キットを使用                                |
| 用いる一次抗体の動物種の ABC キットがない場合          | 使用目的に合った<br>ビオチン標識アフィニティ精製二次抗体 (別売り)<br>+                         |
| 例：一次抗体の由来（または抗原）がヒト IgA の場合*1      | VECTASTAIN ABC スタンダードキット<br>+                                     |
| キットに含まれるビオチン標識二次抗体の特異性が使用目的に適さない場合 | ブロッキング血清<br>(二次抗体の由来動物を選択：別売り)<br>の組み合わせで使用<br>※組み合わせ例については次ページ参照 |
| 染色する切片が一次抗体を作製した動物種と同じ場合*2         | 一次抗体をビオチン標識する (別売り)<br>+  |
| マウス組織の抗原をマウス由来の一次抗体を用いて染色したい場合     | VECTASTAIN ABC スタンダードキット<br>(p.8 参照)<br>の組み合わせで使用                 |
|                                    | Mouse on Mouse (M. O. M.)<br>Immunodetection キット<br>(p.28 参照) を使用 |

\*1 ビオチン標識抗ヒトIgA抗体とVECTASTAIN ABC スタンダードキット (p.8 参照) を組み合わせ使用。

\*2 ビオチン標識二次抗体が組織に内在するイムノグロブリンと結合し、バックグラウンドが高くなる可能性があるため。

※ブロッキング用血清の別売品有り (p.126 参照)。

## カスタム ABC システムの構築例

※目的の ABC Kit がいない場合、スタンダードキット (p.8 参照) およびビオチン標識二次抗体 (p.112 参照)、ブロッキング用正常血清 (p.126 参照) の別売品を組み合わせて、カスタムの ABC システムを構築することが可能です。

| 実験条件   | 最適な ABC キット   |
|--|---|
| マウスの組織をラットモノクローナル抗体を用いて染色する場合<br>→マウス吸収処理済二次抗体を使用し、内在性 IgG によるバックグラウンドを抑える必要があります。 | VECTASTAIN ABC スタンダードキット (#PK-4000)<br>+<br>ビオチン標識抗ラット IgG (H+L) 二次抗体<br>免疫動物：ウサギ (#BA-4001)<br>+<br>ブロッキング用ウサギ正常血清 (#S-5000) |
| ラットの組織をマウスモノクローナル抗体を用いて染色する場合<br>→ラット吸収処理済二次抗体を使用し、内在性 IgG によるバックグラウンドを抑える必要があります。 | VECTASTAIN ABC スタンダードキット (#PK-4000)<br>+<br>ビオチン標識抗マウス IgG (H+L) 二次抗体<br>免疫動物：ウマ (#BA-2001)<br>+<br>ブロッキング用ウマ正常血清 (#S-2000)   |
| ヒトの組織をマウスモノクローナル抗体 (IgM) を用いて染色する場合  | VECTASTAIN ABC スタンダードキット (#PK-4000)<br>+<br>ビオチン標識抗マウス IgM (μ) 二次抗体<br>免疫動物：ヤギ (#BA-2020)<br>+<br>ブロッキング用ヤギ正常血清 (#S-1000)     |

フナコシ Web



### VECTOR 社 免疫組織染色製品選択ガイド <https://www.funakoshi.co.jp/contents/80012>

VECTOR 社の免疫組織染色キット (ABC 法/ポリマー法)、酵素基質 (HRP/AP)、封入剤など、試料の種類や使用する酵素の種類を選んでクリックしていただくだけで目的の製品が見つかる便利なガイドツールです！

例えば…  
 最適な ABC キットを探したい場合

#### 免疫染色(IHC)用製品選択ガイド

目的に応じた免疫染色(IHC)用製品をご検索いただけます。

[免疫染色特集トップ](#)
[免疫染色キット\(ABC法\)](#)
[免疫染色キット\(ポリマー法\)](#)
[HRP/AP基質](#)
[封入剤](#)
[関連製品](#)

step1 から順番に当てはまる条件を選んでください！

#### 免疫染色(IHC)キット選択ガイド(ABC法)

VECTASTAIN ABC Kit / ABC Elite Kitは、アビジン-ビオチン標識酵素複合体 (Avidin - Biotinylated enzyme Complex, ABC 法) を応用した、免疫染色(IHC)用に最適な複合体を形成するように特別に調製されているキットです。VECTASTAIN ABC Eliteキットはより高感度な免疫染色(IHC)キットです。

step1から順に条件を選択すると、ご希望の免疫染色キットをご検索いただけます。

| step1.酵素      | step2.感度 | step3.一次抗体の免疫動物 | step4.切片の動物種 | 検索  |
|---------------|----------|-----------------|--------------|-----|
| --選択--        | --選択--   | --選択--          | --選択--       | 検索  |
| ペルオキシダーゼ(HRP) |          |                 |              | クリア |

アルカリフォスファターゼ(AP) 該当がない場合には、「指定なし」をお選び下さい。  
 ※：一次抗体の動物種がマウスで、マウス組織に対する免疫染色は、M.O.M Immunodetectionキットをおすすめしています。  
 ※：お選びいただく免疫染色キットが無いため、検索よりヒットする3製品を組み合わせてご利用下さい。

## 2. ABC システムを用いた組織染色法

### VECTASTAIN ABC-PO (ペルオキシダーゼ) キット

製品情報 (価格など) p.95, p.109 参照

VECTASTAIN ABC-PO キットには、アビジン DH とビオチン標識西洋ワサビペルオキシダーゼ H が含まれています。これらの試薬は、免疫ペルオキシダーゼ染色に最適な複合体を形成するよう、特別に調製されています。使用前に一定量のアビジン DH とビオチン標識ペルオキシダーゼ H をバッファー中で混合し、30 分間静置するだけで複合体が形成されます。反応時間をそれ以上長くしても、染色感度はあまり増大しません。複合体は形成後数時間は安定です。1 キットで約 220 ml の希釈溶液を調製することができ、1,000~2,000 枚の切片を染色できます。

| VECTASTAIN ABC-PO Kit       | 商品コード   |
|-----------------------------|---------|
| Goat IgG Kit                | PK-4005 |
| Guinea Pig IgG Kit          | PK-4007 |
| Mouse IgG Kit <sup>*1</sup> | PK-4002 |
| Mouse IgM Kit <sup>*2</sup> | PK-4010 |
| Rabbit IgG Kit              | PK-4001 |
| Rat IgG Kit <sup>*3</sup>   | PK-4004 |
| Standard Kit                | PK-4000 |

<sup>\*1</sup> マウス/ラットの組織での使用はお勧めしません。マウス組織の場合は M.O.M. Immunodetection キット (p.28 参照) をご使用下さい。ラット組織の場合は別売りの吸収済みビオチン標識二次抗体 (#BA-2001) (p.112 参照) と組み合わせてご使用下さい。

<sup>\*2</sup> マウス/ラットの組織での使用はお勧めしません。

<sup>\*3</sup> マウス/ラットの組織での使用はお勧めしません。マウス組織の場合は別売りの吸収済みビオチン標識二次抗体 (#BA-4001) と組み合わせてご使用下さい。

### キットに含まれる試薬

|   |
|---|
| ・ ブロッキング用血清 (正常血清)<br>黄色ラベルの小瓶 : 3 ml                     |
| ・ ビオチン標識アフィニティ精製二次抗体<br>青色ラベルの小瓶 : 1 ml                   |
| ・ 試薬 A (アビジン DH) <sup>*</sup><br>橙色ラベルの小瓶 : 2 ml          |
| ・ 試薬 B (ビオチン標識ペルオキシダーゼ H) <sup>*</sup><br>褐色ラベルの小瓶 : 2 ml |

<sup>\*</sup> VECTASTAIN ABC スタンダードキット (#PK-4000) には、試薬 A と B のみが含まれています。

<sup>\*</sup> キットに含まれるブロッキング用血清、ビオチン標識二次抗体は、単品でも購入可能です。

### キットに含まれる試薬以外に必要な試薬

- ・ 一次抗体
- ・ バッファー
- ・ ペルオキシダーゼ基質 (p.39 参照)

### 反応溶液 (Working solution) の調製法

以下のプロトコルは反応液調製に、別売の Utility Dropper Bottle (#MXB-3100, 空のドロPPER ボトル 3 本セット, p.95 参照) を混合瓶として使用した例です。  
<sup>\*</sup> ドロPPER ボトルを使用しない場合は、15 ml チューブなどで反応液を調製し、ピペットを用いて組織切片に滴下して下さい。

混合瓶には最初、滴下用ディスペンサーが差し込んでありません。混合瓶にバッファーと試薬を加えたのち、ディスペンサーを、カチッと音がするまではめ込みます。ディスペンサーを外す場合は、ディスペンサーの首の部分の横から親指で押して外します。外したディスペンサーを他の試薬瓶に間違えてはめて、コンタミネーションを起こさないよう注意して下さい (間違いを防ぐため、各々の混合瓶のラベルに明記して下さい)。液を滴下する際は、瓶の口を垂直に下に向け、静かに押し出して下さい。使用しない時には、蒸発を防ぐために、キャップをしっかりと締めて下さい。

反応溶液の調製は、次の調製法に従って、同じ滴数比を用いることをお勧めしますが、必要に応じて同じ容量比で量を変更して下さい。

- 1) ブロッキング用血清 (正常血清) :  
混合瓶①に 10 ml のバッファーを入れ、ストック溶液 (黄色ラベルの小瓶) を 3 滴加えます。
- 2) ビオチン標識二次抗体 :  
混合瓶②に 10 ml のバッファーを入れ、ストック溶液 (青色ラベルの小瓶) を 1 滴加えます。
- 3) VECTASTAIN ABC 試薬 :  
混合瓶③に 10 ml のバッファーを入れ、試薬 A (橙色ラベルの小瓶) を正確に 2 滴加えます。次に試薬 B (褐色ラベルの小瓶) を正確に 2 滴加え、直ちに混和します。試薬の調製は使用する 30 分前に行って下さい。

**注 :** アジ化ナトリウム、または他のペルオキシダーゼ阻害物質を含む溶液で、ペルオキシダーゼ基質や ABC 試薬を希釈しないで下さい。

## PBS バッファーの調製方法

VECTASTAIN ABC 法には種々のバッファーを使用できますが、最も一般的なものは PBS (10 mM sodium phosphate, 150 mM NaCl (pH 7.5)) で、次のように調製します。

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1.42 g) と NaCl (8.75 g) を蒸留水 (950 ml) に溶解した後、リン酸で pH 7.5 に調整し、終量を 1,000 ml にします。

## 基質

ペルオキシダーゼ基質キットの詳細は p.39 をご覧下さい。

## 組織切片染色法

試薬は、スライド上の切片全体を覆うのに十分な量を滴下して下さい。スライドは保湿チャンパーに入れて反応させます。染色は基質溶液を切片上に滴下するか、または基質溶液を入れた染色皿かカプリン瓶で行います。

### ●パラフィン包埋切片染色法

1. 組織切片をキシレンやその他の脱パラフィン試薬で脱パラフィン化したのち、アルコール濃度を段階的に下げて水和します。
2. 蒸留水で 5 分間洗浄します。
3. 内在性ペルオキシダーゼ活性を除去する必要がある場合は、BLOXALL (#SP-6000, p.23 参照) で 10 分間処理するか、0.3% 過酸化水素 / メタノール (または水) 溶液に浸し、30 分間反応させます\*。内在性ペルオキシダーゼ活性が問題とならない場合は、このステップは省略して下さい。
4. バッファーで 5 分間洗浄します。
5. 調製済みブロッキング用正常血清を滴下し、20 分間反応させます。**血清は二次抗体を作製した動物と同じ動物種の血清**を用います。バックグラウンドが問題とならない場合は、ステップ 5 と 6 は省略できます。
6. 余分な血清を吸い取ります。
7. バッファーで希釈した一次抗体を滴下し、30 分間反応させます。
8. バッファーで 5 分間洗浄します。
9. 調製したビオチン標識二次抗体を滴下し、30 分間反応させます。
10. バッファーで 5 分間洗浄します。
11. ABC 試薬を滴下し、30 分間反応させます。
12. バッファーで 5 分間洗浄します。
13. ペルオキシダーゼ基質溶液を滴下し、適切な染色強度が得られるまで反応させます (用いる基質により反応時間が異なります。詳細は p.48~49 をご覧下さい)。
14. 蒸留水で洗浄します。
15. 対比染色後、洗浄、封入します\*\*。

\* その他の内在性ペルオキシダーゼ除去法については、p.23 をご覧下さい。

\*\* 永久封入する場合は、脱水後に透徹・封入 (非水溶性封入剤を用いる) します。

### ●凍結切片染色法

この方法は、凍結切片、細胞塗抹標本、細胞遠心標本などに適した一般的な方法です。

1. 切片を風乾します。
  2. 染色直前に、アセトンまたは目的の抗原に適した固定液を用いて切片を固定します。
  3. 適当な大きさの容器に入れたバッファー中にスライドを直接入れます。
  4. 内在性ペルオキシダーゼ活性を除去する必要がある場合には、抗原の破壊を抑えるために、温かな処理条件の過酸化水素ブロック処理法を用いて下さい。例えば、
    - ・ BLOXALL (#SP-6000) (p.23 参照) で 10 分間処理
    - ・ 0.3% 正常血清を含む PBS で調製した 0.3% 過酸化水素溶液で 5 分間処理
    - ・ 0.3% 過酸化水素-メタノール溶液で 30 分間処理
 特にモノクローナル抗体を用いる場合には、過酸化水素処理によって抗原が破壊されるおそれがあります。その場合には、ビオチン標識二次抗体と反応させたのちに、内在性ペルオキシダーゼの除去操作を行って下さい\*。
  5. パラフィン包埋切片染色法のステップ 4~15 に従って下さい。
- \* その他の内在性ペルオキシダーゼ除去法については、p.23 をご覧下さい。

**注:** 一次および二次抗体を加えなくても、肥満細胞や他の組織成分が染色されてしまう場合は、0.3~0.5 M 塩化ナトリウムを含むバッファーで ABC 試薬を調製して下さい。非特異的なイオン反応を除くことができます。それでもバックグラウンドを除けない場合は、ステップ 6 の後で、Avidin / Biotin Blocking Kit (#SP-2001) などを使用して下さい。

#### ● MEMO ●

内在性ビオチンなどによる非特異染色が問題となる場合は、別売りの Avidin / Biotin Blocking Kit (#SP-2001) (p.130 参照) でブロックして下さい。

#### ● MEMO ●

必要に応じて Antigen Unmasking Solution (#H-3300, #H-3301) などを用い、抗原を賦活化させて下さい (p.22 参照)。

## VECTASTAIN *Elite* ABC キット VECTASTAIN Universal *Elite* ABC キット R.T.U. VECTASTAIN Universal *Elite* ABC キット

図解操作マニュアル p.43 参照

製品情報 (価格など) p.96 参照

VECTASTAIN *Elite* ABC キットには、アビジン DH とビオチン標識西洋ワサビペルオキシダーゼ H が含まれています。これらの試薬は、免疫ペルオキシダーゼ染色に最適な複合体を形成するよう、特別に調製された試薬です。使用前に一定量のアビジン DH とビオチン標識ペルオキシダーゼ H をバッファー中で混合し、30 分間静置するだけで複合体が形成されます。染色感度は反応時間をそれ以上長くしても、あまり増大しません。複合体は形成後数時間は安定で、場合によっては数日間使用できますが、調製後なるべく早めにご使用いただくことをお勧めします。

VECTASTAIN *Elite* ABC キットの最大の特長は、感度が高く、しかもバックグラウンド染色が低いということです。したがって、通常の VECTASTAIN ABC ペルオキシダーゼキットを使用する場合と比べて、5~10 倍に希釈した一次抗体を使用しても、同程度の染色強度を得ることができます。

**低濃度の抗原部位の確認、神経細胞の染色、また一次抗体の量や費用に限りがある場合に特に有用です。**また染色時間も短縮でき、多重染色にも有用です。

*Elite* ABC キットのほかに、マウスとウサギ由来の一次抗体に共通に使用できる Universal *Elite* ABC キット、およびあらかじめ希釈調製済みの試薬から成る R.T.U. Universal *Elite* ABC キットがあります。*Elite* ABC および Universal *Elite* ABC キットは約 110 ml の反応溶液を調製でき、500~1,000 枚の切片を染色できます。

| VECTASTAIN <i>Elite</i> ABC Kit | 商品コード   |
|---------------------------------|---------|
| Goat IgG Kit                    | PK-6105 |
| Human IgG Kit                   | PK-6103 |
| Mouse IgG Kit <sup>*1</sup>     | PK-6102 |
| Rabbit IgG Kit                  | PK-6101 |
| Rat IgG Kit <sup>*2</sup>       | PK-6104 |
| Sheep IgG Kit                   | PK-6106 |
| Standard Kit                    | PK-6100 |
| Universal Kit                   | PK-6200 |
| R.T.U. Universal Kit            | PK-7200 |

<sup>\*1</sup> マウス/ラットの組織での使用はお勧めしません。マウス組織の場合は M.O.M. Immunodetection キット (p.28 参照) をご使用下さい。ラット組織の場合は別売りの吸収済みビオチン標識二次抗体 (#BA-2001) (p.112 参照) と組み合わせてご使用下さい。

<sup>\*2</sup> マウス/ラットの組織での使用はお勧めしません。マウス組織の場合は別売りの吸収済みビオチン標識二次抗体 (#BA-4001) (p.112 参照) と組み合わせてご使用下さい。

## *Elite* ABC および Universal *Elite* ABC キット に含まれる試薬

|   |
|---|
| ・ブロッッキング用血清 (正常血清)<br>黄色ラベルの小瓶 : 3 ml   |
| ・ビオチン標識アフィニティ精製二次抗体<br>( <i>Elite</i> ABC キット) 青色ラベルの小瓶 : 1 ml                          |
| ・ビオチン標識ユニバーサル二次抗体 (ウマ) <sup>*</sup><br>(Universal <i>Elite</i> ABC キット) 青色ラベルの小瓶 : 1 ml |
| ・試薬 A (アビジン DH)<br>灰色ラベルの小瓶 : 2 ml  |
| ・試薬 B (ビオチン標識ペルオキシダーゼ H)<br>灰色ラベルの小瓶 : 2 ml   |

<sup>\*</sup> マウスとウサギの IgG を認識します。

<sup>\*\*</sup> VECTASTAIN *Elite* ABC スタンダードキット (#PK-6100) には、試薬 A と B のみが含まれています。

<sup>\*\*</sup> キットに含まれるブロッッキング用血清、ビオチン標識二次抗体は、単品でも購入可能です。

## R.T.U. Universal *Elite* ABC キットに含まれる試薬

|  |         |
|--|---------|
| ・正常ウマ血清                                | : 50 ml |
| ・ビオチン標識ユニバーサル二次抗体 <sup>*</sup>         | : 50 ml |
| ・ <i>Elite</i> ABC 試薬<br>(希釈、調製、安定化済み) | : 50 ml |

<sup>\*</sup> マウスとウサギの IgG を認識します。

<sup>\*\*</sup> すべての試薬はあらかじめ希釈、調製、安定化済みなので、そのまますぐに使用できます。

<sup>\*\*</sup> 1 キットで約 250~500 枚の組織切片を染色することができます。

## キットに含まれる試薬以外に必要な試薬

- ・一次抗体
- ・バッファー
- ・ペルオキシダーゼ基質 (p.39 参照)

## 反応溶液 (Working solution) の調製法

以下のプロトコルは反応液調製に、別売の Utility Dropper Bottle (#MXB-3100, 空のドロPPER ボトル 3 本セット, p.95 参照) を混合瓶として使用した例です。

<sup>\*\*</sup> ドロPPER ボトルを使用しない場合は、15 ml チューブなどで反応液を調製し、ピペットを用いて組織切片に滴下して下さい。

混合瓶には最初、滴下用ディスペンサーが差し込んでありません。混合瓶にバッファーと試薬を加えたのち、ディスペンサーを、カチッと音がするまではめ込みます。ディスペンサーを外す場合は、ディスペンサーの首の部分の横から親指で押して外します。外したディスペンサーを他の試薬瓶に間違えてはめて、コンタミネーションを起こさないよう注意して下さい (間違いを防ぐため、各々の混合瓶のラベルの色を変えてあります)。液を滴下する際は、瓶の口を垂直に下に向け、静かに押し出して下さい。使用しない時には、蒸発を防ぐために、白色キャップをしっかり締めて下さい。

反応溶液の調製は、次の調製法に従って、同じ滴数比を用いることをお勧めしますが、必要に応じて同じ容量比で量を変更して下さい。

### ● Elite ABC キット

- 1) ブロッキング用血清（正常血清）：  
混合瓶①に 10 ml のバッファーを入れ、ストック溶液（黄色ラベルの小瓶）を 3 滴加えます。
- 2) ビオチン標識二次抗体：  
混合瓶②に 10 ml のバッファーを入れ、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、次に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 滴加えます。
- 3) VECTASTAIN Elite ABC 試薬：  
混合瓶③に 5 ml のバッファーを入れ、試薬 A（灰色ラベルの小瓶）を正確に 2 滴加えます。次に試薬 B（灰色ラベルの小瓶）を正確に 2 滴加え、直ちに混和します。**試薬の調製は使用する 30 分前に行ってください。**

### ● Universal Elite ABC キット

- 1) ブロッキング用血清（正常ウマ血清）：  
混合瓶①に 5 ml のバッファーを入れ、ストック溶液（黄色ラベルの小瓶）を 1 滴加えます。
- 2) ビオチン標識ユニバーサル抗体：  
混合瓶②に 5 ml のバッファーを入れ、正常血清ストック溶液（黄色ラベルの小瓶）を 2 滴、次にビオチン標識ユニバーサル抗体ストック溶液（青色ラベルの小瓶）を 2 滴加えます。
- 3) VECTASTAIN Elite ABC 試薬：  
混合瓶③に 5 ml のバッファーを入れ、試薬 A（灰色ラベルの小瓶）を正確に 2 滴、次に試薬 B（灰色ラベルの小瓶）を正確に 2 滴加え、直ちに混和します。**試薬の調製は使用する 30 分前に行ってください。**

**注：**アジ化ナトリウムまたは他のペルオキシダーゼ阻害物質を含む溶液で、ペルオキシダーゼ基質や Elite ABC 試薬を希釈しないで下さい。

### PBS バッファーの調製方法

VECTASTAIN Elite ABC 法には種々のバッファーを使用できますが、最も一般的なのは PBS (10 mM sodium phosphate, 150 mM NaCl (pH 7.5)) で、次のように調製します。

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1.42 g) と NaCl (8.75 g) を蒸留水 (950 ml) に溶解した後、リン酸で pH 7.5 に調整し、終量を 1,000 ml にします。

## 基 質

ペルオキシダーゼ基質キットの詳細は p.39 をご覧下さい。

### 組織切片染色法

試薬は、スライド上の切片全体を覆うのに十分な量を滴下して下さい。スライドは保湿チャンバーに入れて反応させます。染色は切片上に基質溶液を滴下するか、または基質溶液を入れた染色皿かカプリン瓶で行います。

#### ●パラフィン包埋切片染色法

VECTASTAIN ABC-PO キットの項 (p.9) をご参照下さい。

※試薬の名称、ラベルの色が異なります。ご注意下さい。

#### ●凍結切片染色法

VECTASTAIN ABC-PO キットの項 (p.9) をご参照下さい。

※試薬の名称、ラベルの色が異なります。ご注意下さい。

#### ●迅速染色法

VECTASTAIN Elite ABC キットは高感度なため、下記の方法に従って、感度や染色強度に影響を与えずに染色時間を短縮することができます。

1. パラフィン包埋切片または凍結切片を、前項に従って調製します。
2. VECTASTAIN Elite ABC キットの試薬調製法を次のように一部変更します。
  - ・ **ビオチン標識二次抗体**：1.5% 正常血清を含む PBS 5 ml にビオチン標識二次抗体ストック溶液 1 滴を加えます (Elite ABC キット)。または、PBS 2.5 ml に正常血清 2 滴を加え、更にユニバーサル二次抗体 2 滴を加えます (Universal Elite ABC キット)。もしバックグラウンドが高い場合には、正常血清の濃度を 10% まで上げて下さい。
  - ・ **VECTASTAIN Elite ABC 試薬**：2.5 ml のバッファーに試薬 A を 2 滴加えて混ぜ、次に試薬 B を 2 滴加え混合します。
3. **試薬の調製は使用する 5~30 分前に行ってください。**
3. 内在性ペルオキシダーゼの除去が必要な場合には、3% 過酸化水素水で 3~5 分間処理、または BLOXALL (#SP-6000, p.23 参照) で 10 分間処理します。
4. 洗浄瓶からバッファーを流しながら、穏やかに洗浄します。
5. バックグラウンドが問題となる場合には、2~10% の正常血清を含むバッファーで 5~10 分間ブロッキング処理を行います。
6. 一次抗体と反応させます\*。
7. ステップ 4 と同様に洗浄します。
8. 希釈したビオチン標識二次抗体を滴下し、10 分間反

応させます。

9. ステップ 4 と同様に洗浄します。
  10. VECTASTAIN *Elite* ABC 試薬を滴下し、5 分間反応させます。
  11. ステップ 4 と同様に洗浄します。
  12. ペルオキシダーゼの基質溶液を滴下し、適切な染色強度が得られるまで反応させます。
  13. ステップ 4 と同様に洗浄します。
  14. 対比染色後、洗浄、封入します。
- \*一次抗体の濃度、染色時間、反応時間は試料に合わせて調整して下さい。*Elite* ABC キットは高感度なので一次抗体の反応時間を短縮できます。例えば、ABC ペルオキシダーゼキットで用いる場合と同じ濃度の一次抗体を用いると反応時間を半分以下に短縮できます。一次抗体の濃度が高ければ、更に反応時間の短縮が可能です。

下記の手順で更に迅速な染色法も可能です。

- 1) ビオチン標識二次抗体の希釈溶液はバッファー 2.5 ml にビオチン標識二次抗体ストック溶液 1 滴を加える (*Elite* ABC キット) か、正常血清 2 滴とユニバーサル二次抗体 4 滴を加えて (Universal *Elite* ABC キット) 調製します。
- 2) *Elite* ABC 試薬の調製法は迅速染色法の場合と同じですが、あらかじめ 37°C に加温して使用します。
- 3) 各試薬との反応時間は各 2 分間です。  
あらかじめ混合希釈済みの R.T.U. VECTASTAIN *Elite* ABC Reagent (#PK-7100) も販売しています。

#### MEMO

試薬 B (ビオチン標識ペルオキシダーゼ H) がまれに茶褐色に変色している場合がありますが、反応性および感度に問題はありません。

#### MEMO

Universal タイプの ABC キットは、マウスおよびラット由来の試料の場合、非特異的な反応を示す可能性があります。

#### MEMO

内在性ビオチンなどによる非特異染色が問題となる場合は、別売りの Avidin / Biotin Blocking Kit (#SP-2001) (p.130 参照) でブロックして下さい。

#### MEMO

必要に応じて Antigen Unmasking Solution (#H-3300, #H-3301) などを用い、抗原を賦活化させて下さい (p.22 参照)。

## VECTASTAIN Universal *Quick* キット R. T. U. VECTASTAIN Universal *Quick* キット

製品情報 (価格など) p.97 参照

VECTASTAIN Universal *Quick* キットは、他の ABC キットと異なり、あらかじめ形成させたビオチン/ストレプトアビジン複合体を用います。また、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ウシの一次抗体を共通に認識するビオチン標識二次抗体を使用しているため、種々の動物種に由来する一次抗体を高い希釈率で使用することができ、迅速に染色結果を得られます。

濃縮ストック溶液から成る Universal *Quick* キット (#PK-8800) と、あらかじめ希釈調製済みの試薬から成る R.T.U. Universal *Quick* キット (#PK-7800) があります。

どちらのキットにも、約 250~500 枚の組織切片を染色するのに十分な量の試薬が含まれています。

### Universal *Quick* キットに含まれる試薬

|                              |        |
|------------------------------|--------|
| ・ブロッキング血清 (正常ウマ血清) :         | 6 ml   |
| ・ビオチン標識ユニバーサル二次抗体* (ウマ) :    | 2.2 ml |
| ・ストレプトアビジン/ペルオキシダーゼ調製済み複合体 : | 1.2 ml |

\*キットに含まれるブロッキング用血清、ビオチン標識二次抗体は、単品でも購入可能です。

### R.T.U. Universal *Quick* キットに含まれる試薬

|                              |       |
|------------------------------|-------|
| ・ブロッキング血清 (正常ウマ血清) :         | 50 ml |
| ・ビオチン標識ユニバーサル二次抗体* :         | 50 ml |
| ・ストレプトアビジン/ペルオキシダーゼ調製済み複合体 : | 50 ml |

\*マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ウシの IgG を共通に認識します。

\*試薬はすべて、あらかじめ希釈・調製済みなので、そのまますぐに使用できます。

### キットに含まれる試薬以外に必要な試薬

- ・一次抗体
- ・バッファー
- ・ペルオキシダーゼ基質 (p.39 参照)

## 反応溶液 (Working solution) の調製法

各試薬は、便利な滴下瓶に入っています。試薬を滴下する際は、瓶の口を垂直に下に向け、静かに押し出してください。反応溶液はガラス製の試験管内で調製します。

### 1) ブロッキング溶液：

2 ml の PBS にブロッキング血清ストック溶液（正常ウマ血清）1 滴を加えます。

### 2) ビオチン標識ユニバーサル二次抗体：

2 ml の PBS にブロッキング血清ストック溶液 4 滴と、ビオチン標識ユニバーサル二次抗体ストック溶液 2 滴を加えます。

### 3) ストレプトアビジン／ペルオキシダーゼ複合体：

2 ml の PBS にストレプトアビジン／ペルオキシダーゼ複合体ストック溶液 1 滴を加えます。

反応溶液は、希釈後すぐに使用できます。未使用の希釈溶液は冷蔵保存することができ、5 日間は感度の著しい低下は見られません。

**注：**アジ化ナトリウムその他のペルオキシダーゼ阻害物質を含む溶液を、ペルオキシダーゼ基質やストレプトアビジン／ペルオキシダーゼ複合体試薬の希釈に用いないで下さい。

## PBS バッファーの調製方法

VECTASTAIN ABC 法には種々のバッファーを使用できますが、最も一般的なものは PBS (10 mM sodium phosphate, 150 mM NaCl (pH 7.5)) で、次のように調製します。

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1.42 g) と NaCl (8.75 g) を蒸留水 (950 ml) に溶解した後、リン酸で pH 7.5 に調整し、終量を 1,000 ml にします。

## 基 質

ペルオキシダーゼ基質キットの詳細は p.39 をご覧ください。

## 組織切片染色法

試薬は、スライド上の切片全体を覆うのに十分な量を滴下して下さい。スライドは、保湿チャンバー内で反応させます。

### ●パラフィン包埋切片染色法

1. 組織切片をキシレンやその他の脱パラフィン試薬で脱パラフィン化したのち、アルコール濃度を段階的に下げて水和します。
2. 蒸留水、次に PBS で短時間洗浄します。
3. 内在性ペルオキシダーゼ活性を除去する必要がある場合は、BLOXALL (#SP-6000, p.23 参照) で 10 分間処理するか、0.3% 過酸化水素 / メタノール（または水）溶液に浸し、30 分間反応させます\*<sup>1</sup>。内在性ペルオキシダーゼ活性が問題とならない場合は、このステップは省略して下さい。
4. 調製したブロッキング血清を滴下し、10 分間反応させます。
5. 余分な血清を吸い取ります。
6. 1.5% ブロッキング血清を含むバッファーで希釈した一次抗体を滴下します。反応時間は、一次抗体の濃度に依存します。一般的には 15~60 分間の反応時間で最適の染色強度が得られるように、一次抗体の濃度を調節します。
7. PBS で 5 分間洗浄します\*<sup>2</sup>。
8. 調製したビオチン標識ユニバーサル二次抗体を滴下し、10 分間反応させます。
9. PBS で 5 分間洗浄します\*<sup>2</sup>。
10. 調製したストレプトアビジン／ペルオキシダーゼ複合体または R.T.U. ストレプトアビジン／ペルオキシダーゼ複合体試薬を滴下し、5 分間反応させます。
11. PBS で 5 分間洗浄します\*<sup>2</sup>。
12. ペルオキシダーゼ基質溶液を滴下し、適切な染色結果が得られるまで反応させます。用いる基質により反応時間が異なります。詳細については p.48~49 をご覧ください。
13. 蒸留水で洗浄します。
14. 対比染色後、洗浄、封入します\*<sup>3</sup>。

\*<sup>1</sup> その他の内在性ペルオキシダーゼ除去法については、p.23 をご覧ください。

\*<sup>2</sup> 洗浄時間は短縮可能です。

\*<sup>3</sup> 永久封入する場合は、脱水後に透徹・封入（非水溶性封入剤を用いる）します。

## ●凍結切片染色法

この方法は、凍結切片、細胞塗抹標本、細胞遠心標本などに適した一般的な方法です。

1. アセトン固定、または目的の抗原に適した方法で固定した標本、あるいは未固定の標本を準備します。
2. 内在性ペルオキシダーゼ活性を除去する必要がある場合には、抗原の破壊を抑えるために、温和な処理条件の過酸化水素ブロック処理法を用いて下さい。例えば、
  - ・ BLOXALL (#SP-6000) (p.23 参照) で 10 分間処理
  - ・ 0.3% 正常血清を含む PBS で調製した 0.3% 過酸化水素溶液で 5 分間処理
  - ・ 0.3% 過酸化水素-メタノール溶液で 30 分間処理
 特にモノクローナル抗体を用いる場合には、過酸化水素処理によって抗原が破壊されるおそれがあります。その場合には、ビオチン標識二次抗体と反応させたのちに、内在性ペルオキシダーゼの除去操作を行って下さい\*。
3. パラフィン包埋切片染色法のステップ 4~14 に従って下さい。

### ● MEMO ●

Universal タイプのキットはマウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ウシ由来の試料の場合、非特異的な反応を引き起こす場合があります。

### ● MEMO ●

内在性ビオチンなどによる非特異染色が問題となる場合は、別売りの Avidin / Biotin Blocking Kit (#SP-2001) (p.130 参照) でブロックして下さい。

### ● MEMO ●

必要に応じて Antigen Unmasking Solution (#H-3300, #H-3301) などを用い、抗原を賦活化させて下さい (p.22 参照)。

## VECTASTAIN ABC-AP キット VECTASTAIN Universal ABC-AP キット

図解操作マニュアル p.44 参照

製品情報 (価格など) p.109 参照

キットにはアビジン DH と、ビオチン標識アルカリホスファターゼ H が含まれています。使用前に一定量のアビジン DH とビオチン標識アルカリホスファターゼ H をバッファー中で混合するだけで、複合体が形成されます。複合体は、調製後約 24 時間安定です。

ABC-AP システムの感度は、~~Low~~ ABC システムと同程度です。少量の抗原でも検出でき、また使用する一次抗体の量も少なく済むため、感度の高い染色が必要な場合に極めて有用です。一般的に染色密度が低いいため、染色した細胞の形態的観察が重要な場合に適しています。また ABC-AP システムは、組織切片中に高レベルの内在性ペルオキシダーゼが存在するために、ABC ペルオキシダーゼシステムが使用できない場合に有用です。なぜなら、ほとんどの内在性アルカリホスファターゼの除去は、ペルオキシダーゼの除去に比べ穏やかな処理で済むからです。また ABC-AP 法と他の ABC 法を併用して、二重染色を行うこともできます。

ABC-AP キットは、1 キットで約 220 ml の反応溶液を調製でき、1,000~2,000 枚の切片を染色できます。また、Universal ABC-AP キットは、マウスとウサギの一次抗体に共通に使用できます。1 キットで約 100 ml の反応溶液を調製でき、約 500~1,000 枚の切片を染色できます。

| VECTASTAIN ABC-AP Kit | 商品コード   |
|-----------------------|---------|
| Mouse IgG Kit*1       | AK-5002 |
| Rabbit IgG Kit        | AK-5001 |
| Rat IgG Kit*2         | AK-5004 |
| Standard Kit          | AK-5000 |
| Universal Kit         | AK-5200 |

\*1 マウス/ラットの組織での使用はお勧めしません。ラット組織の場合は別売りの吸収済みビオチン標識二次抗体 (#BA-2001) (p.112 参照) と組み合わせてご使用下さい。

\*2 マウス/ラットの組織での使用はお勧めしません。マウス組織の場合は別売りの吸収済みビオチン標識二次抗体 (#BA-4001) (p.112 参照) と組み合わせてご使用下さい。

## キットに含まれる試薬

|  |
|--|
| ・ ブロッキング用血清 (正常血清)<br>黄色ラベルの小瓶 : 3 ml                                |
| ・ ビオチン標識アフィニティ精製二次抗体<br>(ABC-AP キット) 青色ラベルの小瓶 : 1 ml                 |
| ・ ビオチン標識ユニバーサル二次抗体 (ウマ)*<br>(Universal ABC-AP キット) 青色ラベルの小瓶 : 2.2 ml |
| ・ 試薬 A (アビジン DH) 赤色ラベルの小瓶 : 2 ml                                     |
| ・ 試薬 B (ビオチン標識アルカリホスファターゼ H) 赤色ラベルの小瓶 : 2 ml                         |

\*マウスとウサギの IgG を認識します。

※VECTASTAIN ABC-AP スタンダードキット (#AK-5000) には、試薬 A と B のみが含まれています。

※キットに含まれるブロッキング用血清、ビオチン標識二次抗体は、単品でも購入可能です。

## キットに含まれる試薬以外に必要な試薬

- ・ 一次抗体
- ・ バッファー
- ・ アルカリホスファターゼ基質 (p.40 参照)

## 反応溶液 (Working solution) の調製法

以下のプロトコルは反応液調製に、別売の Utility Dropper Bottle (#MXB-3100, 空のドロップパーボトル 3 本セット, p.95 参照) を混合瓶として使用した例です。

※ドロップパーボトルを使用しない場合は、15 ml チューブなどで反応液を調製し、ピペットを用いて組織切片に滴下して下さい。

混合瓶には最初、滴下用ディスペンサーが差し込んでありません。混合瓶にバッファーと試薬を加えたのち、ディスペンサーをカチッと音がするまではめ込みます。ディスペンサーを外す場合は、ディスペンサーの首の部分の横から親指で押すと外れます。外したディスペンサーを他の試薬瓶に間違えてはめ、コンタミネーションを起こさないよう注意して下さい (間違いを防ぐため、各々の混合瓶のラベルの色を変えてあります)。液を滴下する際は、瓶の口を垂直に下に向け、静かに押し出して下さい。使用しない時は、蒸発を防ぐために、白色キャップをしっかりと締めて下さい。

反応溶液の調製は、次の調製法に従って、同じ滴数比を用いることをお勧めしますが、必要に応じて同じ容量比で量を変更して下さい。

### ●ABC-AP キット

- 1) ブロッキング用血清 (正常血清) :  
混合瓶①に 10 ml のバッファーを入れ、ストック溶液 (黄色ラベルの小瓶) を 3 滴加えます。
- 2) ビオチン標識二次抗体 :  
混合瓶②に 10 ml のバッファーを入れ、ストック溶液 (青色ラベルの小瓶) を 1 滴加えます。

- 3) VECTASTAIN ABC-AP 試薬 :  
混合瓶③に 10 ml のバッファーを入れ、試薬 A (赤色ラベルの小瓶) を正確に 2 滴加えます。次に試薬 B (赤色ラベルの小瓶) を正確に 2 滴加え、直ちに混和します。試薬の調製は、使用する 30 分前に行ってください。

### ●Universal ABC-AP キット

- 1) ブロッキング用血清 (正常ウマ血清) :  
混合瓶①に 5 ml のバッファーを入れ、ストック溶液 (黄色ラベルの小瓶) を 1 滴加えます。
- 2) ビオチン標識ユニバーサル抗体 :  
混合瓶②に 5 ml のバッファーを入れ、正常血清ストック溶液 (黄色ラベル小瓶) を 2 滴、次にビオチン標識ユニバーサル抗体ストック溶液 (青色ラベル小瓶) を 2 滴加えます。
- 3) ABC-AP 試薬 :  
混合瓶③に 10 ml のバッファーを入れ、試薬 A を正確に 2 滴、次に試薬 B を正確に 2 滴加え、直ちに混和します。試薬の調製は、使用する 30 分前に行ってください。

## PBS バッファーの調製方法

VECTASTAIN ABC-AP 法には種々のバッファーを使用できますが、最も一般的なのは PBS (10 mM sodium phosphate, 150 mM NaCl (pH 7.5)) で、次のように調製します。

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1.42 g) と NaCl (8.75 g) を蒸留水 (950 ml) に溶解した後、リン酸で pH7.5 に調製し、終量を 1,000 ml にします。

## 基質

アルカリホスファターゼは、アルカリ性領域でリン酸モノエステル結合の加水分解を触媒します。免疫組織化学染色に用いる場合には、加水分解の過程で生じる可溶性生成物を捕捉試薬 (Capture reagent) とカップリングさせ、着色不溶性沈殿を生じさせることによって、アルカリホスファターゼ活性を検出します。ABC-AP キット用基質として Kit I (VECTOR Red : #SK-5100), Kit II (VECTOR Black : #SK-5200), Kit III (VECTOR Blue : #SK-5300) Kit IV (BCIP / NBT : #SK-5400), ImmPACT Vector Red (#SK-5105) の 5 種類の基質キットを販売しています。詳細は p.40 をご覧下さい。

**注：**パラフィン切片の内在性アルカリホスファターゼ活性は、一般に凍結切片に比べ弱く、抗原を賦活するための高温処理を行うと完全に除去されます。内在性アルカリホスファターゼ活性が、腸型アイソザイム以外の場合は、基質溶液の調製に使用するバッファーに1 mM Levamisole (#SP-5000, p.129 参照)を加えることでブロックできます。腸型アイソザイムの場合は、染色前に切片を20% 酢酸で4℃、15 秒間処理するか、または2.3% 過ヨウ素酸で5 分間処理したのち、0.02% 水酸化ホウ素カリウムで2 分間処理することでブロックできます (*J. Clin. Pathol.*, **34**, 1349 (1981).)。その他の内在性アルカリホスファターゼ除去法については p.23 をご覧ください。

## 組織切片染色法

試薬は、スライド上の切片全体を覆うのに十分な量を滴下して下さい。スライドは保湿チャンバーに入れて反応させて下さい。染色は切片上に基質溶液を滴下するか、または基質溶液を入れた染色皿かカプリン瓶中で行います。

### ●パラフィン包埋切片染色法

1. 組織切片をキシレンやその他の脱パラフィン試薬で脱パラフィン化したのち、アルコール濃度を段階的に下げて水和します。
  2. 蒸留水で5 分間洗浄します。
  3. バッファーで5 分間洗浄します。
  4. 調製済みブロッキング用正常血清を滴下し、20 分間反応させます。**血清は二次抗体を作製した動物と同じ動物種の血清を用います。**バックグラウンドが問題にならない場合は、ステップ4 と5 は省略して下さい。
  5. 余分な血清を吸い取ります。
  6. バッファーで希釈した一次抗体を滴下し、30 分間反応させます。
  7. バッファーで5 分間洗浄します。
  8. 調製したビオチン標識二次抗体 (ABC-AP キット)、またはユニバーサル二次抗体 (Universal ABC-AP キット) を滴下し、30 分間反応させます。
  9. バッファーで5 分間洗浄します。
  10. 調製したABC-AP 試薬を滴下し、30 分間反応させます。
  11. バッファーで5 分間洗浄します。
  12. アルカリホスファターゼ基質溶液を滴下し、20~30 分間反応させます。
  13. 蒸留水で洗浄します。
  14. 対比染色後、洗浄、封入します\*。
- \*永久封入する場合は、脱水後に透徹・封入（非水溶性封入剤を用いる）します。

### ●凍結切片染色法

この方法は、凍結切片、細胞塗抹標本、細胞遠心標本などに適した一般的な方法です。

1. 切片を風乾します。
2. 染色直前に、アセトンまたは目的の抗原に適した固定液を用いて切片を固定します。
3. 適当な大きさの容器に入れたバッファー中に、スライドを直接入れます。
4. パラフィン包埋切片染色法のステップ4~14 に従って下さい。

### ●迅速染色法

VECTASTAIN ABC-AP 法は高感度なため、下記の方法に従えば、感度や染色強度に影響を与えずに染色時間を短縮できます。

1. パラフィン包埋または凍結切片を前項に従って調製します。
2. 試薬溶液の調製法を次のように変更します。
  - ・ **ビオチン標識二次抗体**：1.5% 正常血清を含む PBS 5 ml にビオチン標識二次抗体ストック溶液を1 滴加えます (ABC-AP キット)。PBS 2.5 ml に正常血清ストック溶液2 滴を加え、更にユニバーサル二次抗体ストック溶液を1 滴加えます (Universal ABC-AP キット)。バックグラウンドが高い場合は、正常血清の濃度を10% まで上げて下さい。
  - ・ **VECTASTAIN ABC-AP 試薬**：5.0 ml の PBS に試薬 A を2 滴加えて混和し、次に試薬 B を2 滴加えて混和します。
3. **試薬の調製は、使用する5~30 分前に行って下さい。**バックグラウンドが問題になる場合は、切片を2~10% の正常血清を含むバッファー中で、5~10 分間反応させます。
4. 一次抗体を滴下します。一次抗体の濃度、反応時間、反応温度は、用いる一次抗体によって異なります。
5. 洗浄瓶からバッファーを流しながら洗浄します。
6. 調製したビオチン標識二次抗体またはユニバーサル二次抗体を滴下し、10 分間反応させます。
7. ステップ5 と同様に洗浄します。
8. VECTASTAIN ABC-AP 試薬を滴下し、5 分間反応させます。
9. ステップ5 と同様に洗浄します。
10. 基質溶液を滴下し、適切な染色強度が得られるまで反応させます。
11. ステップ5 と同様に洗浄します。
12. 対比染色後、洗浄、封入します。

下記の手順で更に迅速な染色法も可能です。

- 1) ビオチン標識二次抗体の希釈溶液はバッファー 2.5 ml にビオチン標識二次抗体ストック溶液 1 滴 (ABC-AP キット), または 4 滴 (Universal ABC-AP キット) を加えて調製します。
- 2) ABC-AP 試薬の調製法は前記の迅速染色法の場合と同じですが, 37°C に加温して使用します。
- 3) 各試薬との反応時間は各 2 分間です。

#### ● MEMO ●

Universal タイプの ABC キットは, マウスおよびラット由来の試料の場合, 非特異的な反応を示す可能性があります。

#### ● MEMO ●

内在性ビオチンなどによる非特異染色が問題となる場合は, 別売りの Avidin / Biotin Blocking Kit (#SP-2001) (p.130 参照) でブロックして下さい。

#### ● MEMO ●

必要に応じて Antigen Unmasking Solution (#H-3300, #H-3301) などを用い, 抗原を賦活化させて下さい (p.22 参照)。

## ABC システムを用いた二重染色法

同一組織切片中の複数の抗原を, ABC 法を用いて免疫組織化学的に検出する二重染色法には, 二つの方法があります。

1. 同一酵素と, それに対応する複数の基質の組み合わせ (例: *Ekt* ABC キット + DAB, AEC, TMB などの基質)。
2. 複数の酵素と, 各酵素に対応する基質の組み合わせ (例: *Ekt* ABC キット + DAB, ABC-AP キット + VECTOR Red)。

※p.102 をあわせてご覧下さい。

### 組織切片の前処理方法

以下のプロトコルは, ホルマリンで固定し, パラフィン包埋した組織切片中の複数の抗原を, *Ekt* ABC または ABC-AP キットを用いて, 同じ動物種で作製した複数の一次抗体で検出するための基本的な方法ですが, 異なる動物種で作製した一次抗体を用いた場合にも応用できます。反応は特に記載のない限り, すべて室温で行います。

1. 組織切片を脱パラフィン化した後, アルコール濃度を段階的に下げて水和します。
2. 蒸留水で 5 分間洗浄します。
3. 切片中の内在性のペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ活性が存在し, それが問題となる場合は, 適当な方法で不活性化します (p.23 参照)。
4. バッファー (PBS または TBS を推奨) で 3 分間ずつ 2 回洗浄します。

### ●第 1 の抗原検出

#### 1. ブロッキング操作

第 1 の ABC キットに含まれる 5% 正常血清を含む PBS を切片上に滴下し, 20 分間反応させます。

#### 2. 一次抗体

1. 切片から余分なブロッキング溶液を吸い取ります。
2. 5% 正常血清を含む PBS で希釈した第 1 の一次抗体を滴下します。抗体濃度と反応時間の最適条件は適宜検討して下さい。
3. PBS で 3 分間ずつ 2 回洗浄します。

#### 3. 二次抗体

1. 5% 正常血清を含む PBS で希釈した第 1 のビオチン標識二次抗体を滴下し, 30 分間反応させます。
2. PBS で 3 分間ずつ 2 回洗浄します。

#### 4. ABC 試薬

1. キットの使用説明書に従って調製した第 1 の ABC 試薬を滴下し, 30 分間反応させます。
2. PBS で 3 分間ずつ 2 回洗浄します。

#### 5. 基質

1. 基質溶液を滴下し, 適切な染色結果が得られるまで反応させます (基質キットの使用説明書に書いてある反応時間を参考にして下さい)。
2. PBS で 3 分間ずつ 2 回洗浄します。

## ● 第2の抗原検出

### 1. ブロッキング操作\*1

第2のABCキットに含まれる5%正常血清を含むPBSを切片上に滴下し、20分間反応させます。

### 2. 一次抗体

1. 切片から余分なブロッキング溶液を吸い取ります。
2. 5%正常血清を含むPBSで希釈した第2の一次抗体を滴下します。抗体濃度と反応時間の最適条件は事前に検討する必要があります。

3. PBSで3分間ずつ2回洗浄します。

### 3. 二次抗体\*1

1. 5%正常血清を含むPBSで希釈した第2のビオチン標識二次抗体を滴下し、30分間反応させます。
2. PBSで3分間ずつ2回洗浄します。

### 4. ABC試薬\*2

1. キットの使用説明書に従って調製した第2のABC試薬を滴下し、30分間反応させます。
2. PBSで3分間ずつ2回洗浄します。

### 5. 基質

1. 第1の抗原検出とは異なる基質溶液を滴下し、適切な染色結果が得られるまで反応させます（基質キットの使用説明書に書いてある反応時間を参考にして下さい）。
2. PBSで3分間ずつ2回洗浄します。
3. 蒸留水で5分間洗浄します。

### 6. 封入（場合により、対比染色後に封入します）

\*1 第1と第2の一次抗体が同じ動物種で作製されている場合（例えば2種類のマウスモノクローナル抗体を用いた場合）は、同じ正常血清とビオチン標識二次抗体を第1・第2の抗原検出に共通に使用できます。

（例）一次抗体

第1抗体→マウス由来

第2抗体→マウス由来

二次抗体

Anti-Mouse IgG (#BA-2000)

\*2 同じ酵素を用いて異なる抗原を検出する場合は、同じABC試薬を第1・第2抗原検出に共通に使用できます。

（例）第1抗体→ABC-*ABC*試薬

→DAB基質（褐色）

第2抗体→ABC-*ABC*試薬

→TMB基質（青色）

※三重染色を行う場合、第3の抗原の検出も、第3の一次抗体を用いて、前述と同じプロトコルで行うことができます。

※上記のプロトコルは基本的なもので、それぞれの場合に応じて、実験条件を検討する必要があります。

※必ずコントロール染色を行って下さい。

## 迅速染色法

前述した「第1の抗原検出」および「第2の抗原検出」の操作を以下のように変更すれば、二重染色を短時間で行うことができます。

### 1. ブロッキング操作

正常血清を10%含むPBSを用い、5~10分間反応させます。

### 2. 一次抗体

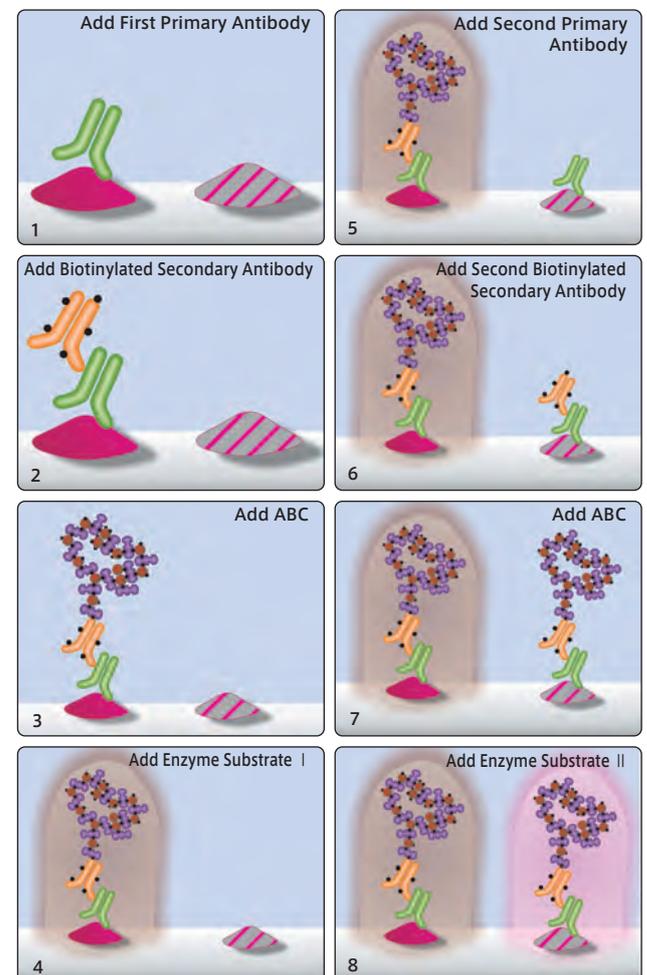
一次抗体の濃度を高くすると、反応時間を短縮できます。

### 3. 二次抗体

2倍濃度のビオチン標識二次抗体および正常血清を含む反応液を用い、10分間反応させます。

### 4. ABC試薬

2倍濃度のABC試薬を用いれば、反応時間を5~10分間に短縮できます。



## 二重染色法を行う場合の注意事項

### ●酵素と基質の選択

用いる酵素と基質により、異なった特徴を持つ染色像が生じます。

#### 1. ペルオキシダーゼ

シャープで高密度な沈殿物を生じるため、輪郭のはっきりした染色像を得ることができます。

#### 2. アルカリホスファターゼ

比較的染色密度が低く、半透明な沈殿物を生じるため、細胞の形態的特徴を観察するのに適しています。

### ●2種類の抗原の検出順序

抗原の検出順序は、染色の質とパターンに大きく影響します。

1. 二つの検出システムを選択した場合、二つの抗原をそれぞれの抗原に対応する一次抗体を用いて、別々に染色して下さい（一重染色）。
2. 一重染色法により最適反応条件を決めます。例えば、高温処理による抗原の賦活化やタンパク質分解酵素処理などの前処理、抗体力価、反応濃度や反応時間を決定します。これらの予備実験は、抗原の最適な染色に不可欠です。反応条件を決定した後、その条件で二重染色を行います。
3. 最適条件下で一重染色した切片をコントロールとし、二重染色法で染色した抗原の染色パターンの比較を行います。
4. 第1の抗原の検出システムが第2の抗原の検出に影響を及ぼさないかどうかを確認するために、最初に用いる一次抗体と2番目に用いる一次抗体の使用順序を変えて二重染色を行い、それぞれのパターンを比較します。

※酵素／基質の選択は良い染色結果を得るために重要です。染色法の選択と色の組み合わせについては p.102 をご参照下さい。

### ●染色強度

最良の染色結果を得るには、二つの基質の着色沈殿物の発色強度のバランスが重要な要因となります。

1. 顕微鏡下で発色度を観察しながら染色を行うと、良い結果が得られます（特に第2の抗原の染色の場合）。
2. 各ABCキットと基質キットは検出感度が異なります。したがって、一次抗体濃度は用いるキットの感度に合わせて調製する必要があります。

3. 酵素を用いた同一細胞内における2種類の抗原の検出は、抗原が別々の細胞画分に存在する場合に限り可能です。着色沈殿物による抗原部位のブロッキングが起こる場合、特に2種類の抗原が同一細胞の同一画分に存在する場合（2種類とも核に存在する場合など）は、蛍光法を用いる方がよいでしょう。
4. 複数の抗原を染色する場合、対比染色は必要ないこともあります。対比染色を行う場合は、着色沈殿物の色と比較し、用いた検出システムに適合する対比染色剤を選びます。p.133 をご参照下さい。

### ●バックグラウンド

多重染色の場合、一般的にバックグラウンドが高くなります。これを避けるために、下記の方法を試して下さい。

1. ブロッキング溶液や抗体溶液中の正常血清濃度を上げる、免疫組織染色用BSA（#SP-5050, p.131 参照）を用いる、またはTween 20を0.2%になるように加えるなどの操作を行って下さい。
2. 第2（または第3）の抗原の検出に用いるビオチン標識二次抗体が、第1の抗原検出ステップで用いた正常血清中のイムノグロブリンと結合すると、バックグラウンドが高くなります。この場合、第2のビオチン標識二次抗体を、2~5%の第1の正常血清を含むバッファーで希釈すると、バックグラウンドを低減できます。また二次抗体で認識されない他の動物種のブロッキング血清や、免疫組織染色用BSA（#SP-5050）などのブロッキング剤で代用できます。

### ●コントロール切片

二重染色法で得られた結果を正しく解釈するためには、コントロール切片が非常に重要です。

1. 切片に内在性酵素が存在する（基質を加えただけで発色する）場合は、内在性酵素の不活性化処理が必要です（p.23 参照）。
2. 同じ動物種の二つの一次抗体で二重染色を行う場合は、一重染色で用いられる通常のコントロールに加え、第2の一次抗体を目的の抗原とは反応しない抗体に替えて同じ濃度範囲で使用し、染色が第2の一次抗体と第1の二次抗体の結合によるものかを判断することができます。
3. 第1の染色で発色した反応物質は、第2の染色段階で抗体やABC試薬が第1の染色に使用した試薬と結合するのを阻害します。これにより、同じ動物種で免疫した抗体や同じVECTASTAIN ABC Kitを用いて多重染色が可能となります。
4. 染色の前または第1の染色と第2の染色間にAvidin / Biotin Blocking Kit（#SP-2001, p.130 参照）などを用いて内在性ビオチンのブロッキングが必要になることがあります。染色操作中に行う場合は、第1の基質で染色した後で第2の一次抗体を滴下する前にブロッキングを行って下さい。

### ●染色操作を中断する場合

多重染色法では、抗原の反応に必要な時間を延長することができます。

1. 染色操作は必要に応じて染色プロトコル中に中断できます。通常は、第1の抗原の染色後に中断するのが良いでしょう。切片は染色操作を再開するまで、PBS中4℃で保存します。
2. 操作中に一時中断したい場合は、切片を湿度のある場所で、抗原を保持できるような条件下で保管して下さい。

### VECTASTAIN ABC キット 使用上の注意

- 1) 切片は十分注意して操作して下さい。固定（通常、4%ホルムアルデヒドを超えない濃度のホルマリンバッファーを使用）は、染色操作中に、切片の状態を完全に保つために、十分でなくてはなりません。目的の抗原が損なわれないように注意して下さい。染色操作中に切片を乾燥させないで下さい。反応は保湿チャンバー内で行って下さい。場合により、Antigen Unmasking Solution（#H-3300, #H-3301）を用いて高温処理すると、固定による抗原エピトープのマスキングを回復することができます（p.22 参照）。
- 2) 組織標本を60℃以上に熱したパラフィンに包埋しないで下さい。温度を上げ過ぎると抗原が破壊される恐れがあります。
- 3) パラフィン包埋組織ブロックは、密閉容器中で冷蔵保存して下さい。
- 4) スライドガラスから組織切片がはがれるのを防ぐには、スライドを非タンパク質性の組織切片用接着剤、VECTABOND（#SP-1800, p.163 参照）で処理して下さい。卵白アルブミンでコートしたスライドは使用しないで下さい。卵白に含まれる微量のアビジンが、染色結果に影響することがあります。
- 5) ハンドローションなどはスライドから切片がはがれる原因となったり、試薬の浸透を妨げる原因となります。油の付着した手で洗浄容器に触れないで下さい。
- 6) 切片から完全にパラフィンを除去することが重要です。脱パラフィン剤およびアルコール溶液の濃度は、正確なものを使用して下さい。すべての脱パラフィン操作は、切片からパラフィンを完全に除去するのに必要な時間を十分取って下さい。
- 7) 封入後、パラフィン切片は50～56℃のエアオープン中で乾燥して下さい。スライド加熱器には局所的に高温になる“ホットスポット”が存在する場合があります。組織を過熱するおそれがあるため、避けた方が良いでしょう。
- 8) 試薬はすべて、至適濃度で使用して下さい。VECTASTAIN ABC法は、非常に感度が高いため、通常一次抗体を高度に希釈して使用しますが、希釈溶液を調製するためのプラスチックまたはガラス容器に抗体が吸着するのを防ぐため、一次抗体の希釈には0.1%免疫組織染色用ウシ血清アルブミン（BSA：#SP-5050, p.131 参照）を含むバッファー、またはキットに含まれるブロッキング用血清を希釈した溶液（10 mlのバッファーにストック溶液2滴を加える）を用いて下さい。
- 9) ビオチン標識二次抗体およびABC試薬を更に薄めて使用する場合は、まず使用説明書に従って試薬を希釈したのち、0.1%免疫組織染色用ウシ血清アルブミン（BSA：#SP-5050）を含むバッファーで適宜希釈して下さい。免疫組織染色用以外のBSAは、不純物が混在しているおそれがあります。場合により、試薬の希釈度を上げる、反応時間を長くする、または

- 反応温度を上げることが必要になる場合があります。
- 10) ごく少量の希釈溶液を調製する場合は、ストック溶液 1 滴を小さな円錐形プラスチックチューブに滴下し、そこから必要量を採って下さい。汚染を避けるため、ストック溶液の入った瓶のディスペンサーは外さないで下さい。
  - 11) 正常血清、脱脂粉乳、培養液などビオチンを含む可能性のあるものを ABC 試薬に入れしないで下さい。感度が下がることがあります。
  - 12) 用時調製したバッファーを使用して下さい。バクテリアが繁殖したバッファーを使用すると、染色に影響します。脱イオン水には（電気伝導度が低くても）ペルオキシダーゼの阻害物質が含まれていることがあります。ABC 試薬と基質溶液は、容器を用い蒸留水で調製して下さい。
  - 13) 切片中の抗原濃度が高い場合は、一次抗体、ビオチン標識二次抗体、ABC 試薬との反応時間を短縮できます。また反応温度を上げて反応時間を短縮することが可能です。
  - 14) 神経組織切片または厚い切片を染色する場合や抗原濃度が低い場合は、反応時間を延長する必要があります。
  - 15) 染色終了後、使用した希釈試薬溶液は捨て、容器を蒸留水で洗い、キットの箱にストック試薬と一緒に納め、冷蔵保存して下さい。
  - 16) VECTASTAIN ABC キットの各ストック試薬、R.T.U. 試薬および基質キットの各ストック試薬は冷蔵保存し、キットの箱の裏に記してある日付までにご使用下さい。キット中の試薬 A と試薬 B は、適切な染色結果が得られるように管理されたロットの組み合わせになっています。**異なるロットの試薬 A と試薬 B を一緒に使用しないで下さい。**試薬は購入時の箱に保存しておくことをお勧めします。試薬を箱から取り出す場合は、箱の底の日付を試薬瓶に書いて、試薬のロットが分かるようにしておいて下さい。
  - 17) VECTASTAIN ABC キットに含まれるアフィニティ精製ビオチン標識二次抗体と正常血清は、別途販売していますが、アビジン DH とビオチン標識ペルオキシダーゼ H、ビオチン標識アルカリホスファターゼ H は、VECTASTAIN ABC キット用に特別に調製された試薬です。単品では販売していません。これらの試薬と Avidin D (#A-2000) を混同しないようご注意ください。必ず各々の VECTASTAIN ABC キットに含まれる ABC 試薬をご使用下さい。**ABCスタンダードキットには、アビジン DH と、各キットごとにビオチン標識ペルオキシダーゼ H またはビオチン標識アルカリホスファターゼ H のみが含まれています。ビオチン標識二次抗体と正常血清は、別途購入して下さい。**
  - 18) 内在性ビオチン等による非特異的染色が問題となる場合は、別売りの Avidin / Biotin Blocking Kit (#SP-2001, p.130 参照) でブロッキングして下さい。
  - 19) **DAB 基質キットに含まれる DAB と塩化ニッケルには発がん性の疑いがあります。またその他のペルオキシダーゼ、およびアルカリホスファターゼの基質成分の発がん性、毒性については、ほとんど分かっていません。これらの試薬を取り扱う際は、手袋、防護用衣服、防護メガネなどを着用し、十分注意を払って下さい。また使用済み溶液の廃棄は所定の廃棄法に従って下さい。**

## トラブルシューティングガイド

VECTASTAIN ABC キットを構成するそれぞれの試薬は、常に最適な染色結果が得られるように、細心の注意を払い製造されています。キットに含まれるすべての試薬は、様々な品質試験を実施しており、また、長期間の保存についてもその品質を保持することを確認しています。

しかし、製品の品質以外の原因で問題が生じることがあります。例えば、組織染色の際バックグラウンドが非常に高い、また組織切片上で非特異的な染色が生じてしまう可能性もあります。また、予想よりも染色が非常に薄く、検出されないなどのケースもあり得ます。

予想したものと異なる染色結果が得られた場合、すべての原因を特定することは難しく、また、問題解決には多大な時間と操作が必要になります。次ページからのトラブルシューティングガイドは、ペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼを使用した VECTASTAIN ABC キットを用い、免疫組織化学染色を行う際に生じる問題に、よく見られる共通の原因とその解決方法を解説しています。

また、事例 2 の注には、免疫組織化学染色の操作を最適化するための一般的な注意事項が書かれています。

・ Antigen Unmasking Solution を用いた抗原賦活化法

➡ p.22

・ 内在性ペルオキシダーゼ活性のブロッキング法

➡ p.23

・ 内在性アルカリホスファターゼ活性のブロッキング法

➡ p.23

・ 非特異的な染色が生じた場合

・ バックグラウンドの染色が生じた場合

➡ **事例 1** (p.24~25)

・ 染色が弱い場合

・ まったく染色されない場合

➡ **事例 2** (p.26~27)

## ● Antigen Unmasking Solution を用いた抗原賦活化法

1. 切片をスライドに接着します。スライドはあらかじめ VECTABOND Reagent (#SP-1800, p.163 参照) で処理しておきます。
2. 脱パラフィン後、蒸留水で水和します。
3. ステンレス製の圧力鍋 (4 リットル以上) に 1,500~1,600 ml の蒸留水を注ぎます。
4. 開封前によく振った Antigen Unmasking Solution (#H-3300 または #H-3301, p.122 参照) を 15 ml 加えます。
5. 圧力鍋の蓋をして (ロックはしない)、沸騰するまで加熱します。
6. 金属製のラックにスライドを置きます。複数枚ある場合は離して置いて下さい。圧力鍋の蓋を開け、スライドが Antigen Unmasking Solution に浸るように入れます。
7. 圧力鍋の蓋をして、ロックします。安全ロックピン (圧力鍋により名称が異なります) が上がるまで加熱します。
8. 蒸気が上がった時点をスタート時間とし (通常, 5 分程度かかります), 1 分 (または一次抗体のデータシート等で指定されている時間) 後に加熱を止めます。圧力鍋をシンク等に移し (高温注意), 蓋に冷水をかけて急冷します。
9. 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ます (高温注意)。
10. スライドを取り出し (高温注意), 切片が乾燥しないように速やかに蒸留水に浸します。必要に応じて ImmEdge-Pen (#H-4000, p.255 参照) を用い、スライドの周囲を疎水性バリアで囲って下さい。
11. スライドを PBS バッファー (pH 7.5) または TBS バッファー (pH 7.4) で 5 分間洗浄します。
12. 通常の組織染色プロトコル (正常血清によるブロッキング操作のステップ) へ進んで下さい。

## ● 内在性ペルオキシダーゼ活性のブロッキング法

方法 1 : 1~2 滴の BLOXALL Blocking Solution (#SP-6000) を免疫操作の前に切片試料に添加し、室温で 10 分間処理する

内在性ペルオキシダーゼ活性とアルカリホスファターゼ活性の両者を一度に阻害できます。

※製品については p.130 参照。

方法 2 : 3% 過酸化水素溶液で 5 分間反応させ、水で 2~3 分間洗浄する

最も迅速で簡便なブロッキング法ですが、操作中に発生する気泡により、凍結切片や、内在性ペルオキシダーゼ活性が高い標本（塗抹血液標本等）に、損傷を及ぼす可能性があります。

方法 3 : 0.3% 過酸化水素/メタノール溶液で 20~30 分間反応させ、水で 2~3 分間洗浄する

内在性ペルオキシダーゼ活性が高い切片や凍結切片に適しています（例：塗抹血液標本や細胞遠心標本）。

試料に合わせ過酸化水素の濃度を上げたり、反応時間を短くすることもできます。メタノールはヘムの破壊を促進するため、低い過酸化水素濃度で長時間の反応処理が必要です。この方法は細胞表面マーカーの場合を除き、一般的に使用される優れた方法です。

方法 4 : 180 mg  $\beta$ -D (+) グルコース, 5 mg グルコースオキシダーゼ, 6.5 mg アジ化ナトリウム/50 ml PBS で 37°C, 1 時間反応させ、PBS で 5 分間の洗浄を 3 回繰り返す

グルコースオキシダーゼの酵素反応により、非常にゆっくり、かつ持続的に低濃度の過酸化水素を生成します。ペルオキシダーゼ活性が持続的に完全に阻害されるので、あらかじめ過酸化水素を加える方法よりも優れた方法とされています。

参考文献 : Andrew S. M., Jasani, B., *Histochem. J.* 19: 426-430 (1987).

方法 5 : 0.3% 過酸化水素/40% メタノール (PBS 溶液) で一晩反応させる

造血組織の膜マーカーを保存する場合に優れた方法です。

方法 6 : 100% エタノールで固定後, 0.75% 塩酸 (0.2 ml 濃塩酸 / 100 ml エタノール) で, 15 分間室温で反応させる

方法 7 : 0.01% 過ヨウ素酸で 10 分間反応させ、続いて生成するアルデヒドを低減するため、水素化ホウ素ナトリウム水溶液 (0.1 mg/ml) で 2 分間処理する

方法 8 : 0.05% アジ化ナトリウム (DAB/過酸化水素溶液に混合) で処理する

方法 9 : 0.1% フェニルヒドラジンで 37°C, 60 分間処理する

方法 10 : 1% ニトロフェリシアン酸ナトリウム (酢酸/純エタノール混合) で処理する

## ● 内在性アルカリホスファターゼ活性のブロッキング法

方法 1 : 1~2 滴の BLOXALL Blocking Solution (#SP-6000) を免疫操作の前に切片試料に添加し、室温で 10 分間処理する。

内在性ペルオキシダーゼ活性とアルカリホスファターゼ活性の両者を一度に阻害できます。

※製品については p.130 参照。

方法 2 : 1 滴の Levamisole (#SP-5000) を 5 ml の基質溶液に加える

この処理は腎臓、肝臓、胎盤、骨、B 細胞由来の試料には適していますが、腸 (管) 由来の試料には適用できません。腸 (管) 由来の試料の場合は、方法 7 または方法 8 をご覧下さい。

※製品については p.129 参照。

方法 3 : 染色前に 20% 酢酸で 4°C, 15 分間処理する

方法 4 : 脱パラフィン化の過程で, 95% アルコール処理時に 5% 塩酸を加える

方法 5 : 15% 氷酢酸で 5 分間室温で処理する

方法 6 : Bouin's 溶液で 5 分間処理する

方法 1~5 の参考文献 :

Elias, J. M., *Immunohistopathology, A Practical Approach to Diagnosis*. ASCP Press (1990).

方法 7 : 6% 過酸化水素で 10 分間処理後, 2.28% 過ヨウ素酸で 5 分間処理し, 更に 0.02% 水素化ホウ素カリウムで 2 分間処理する

内在性ペルオキシダーゼ活性を抑えることもでき、腸 (管) 由来の試料に適用できます。

方法 8 : 20% 酢酸で 4°C, 15 秒間処理, 2.3% 過ヨウ素酸で 5 分間処理し更に, 0.02% 水素化ホウ素カリウムで 2 分間処理する

染色前に行います。腸 (管) 由来の試料に有効です。

参考文献 :

Bulman AS and Heyderman E, *J. Clin. Pathol.*, 34, 1349-1351 (1981).

## 事例 1：コントロール切片で高いバックグラウンドまたは非特異的な染色が生じた場合

A～D の条件でコントロール実験を行い、問題点を検討して下さい。

2

ABCシステムを用いた組織染色法

免疫染色実験ガイド 2019-2020

A

●基質のみを使用した

染色される場合

染色されない場合

→ B へ

内在性酵素による、発色反応が引き起こされる可能性があります。

①コントロールは必ず実際の試料と同じ条件で発色反応を実施して下さい。染色時間が長くなると、バックグラウンドが高くなる可能性があります。

②全体的にバックグラウンドが高い場合は、組織切片を作製する際、内在性酵素により汚染されている可能性があります。

⇒内在性酵素を適切な方法であらかじめブロッキングして下さい。

内在性酵素活性のブロッキングに関する詳細は p.23 をご覧下さい。

B

●ブロッキング血清

↓  
●ABC 試薬

↓  
●基質を使用した

染色される場合

染色されない場合

→ C へ

ABC 試薬が、主に以下の三つの原因により、組織間に結合している可能性があります。それぞれの原因に対して、以下の対策がとれます。

①ビオチンと結合している内在性タンパク質の存在

⇒アビジン/ビオチンのブロッキングを行って下さい Avidin/Biotin Blocking Kit (#SP-2001, p.130 参照) をお使い下さい。

②内在性レクチンの存在

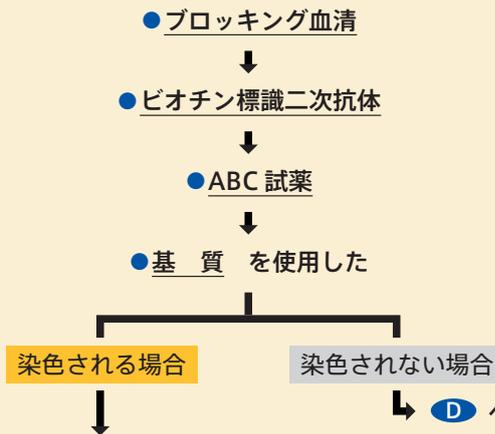
⇒ABC 試薬希釈液に 0.2 M  $\alpha$ -methyl-mannoside (#S-9005) を加えて下さい。

③イオン間相互作用

⇒0.5 M 塩化ナトリウムを含むバッファーで ABC 試薬を調製して下さい。

また、正常血清によるブロッキング操作の後に、アビジン/ビオチンブロッキング操作を実施することにより、ABC 試薬と上記①～③の原因による結合を除去することができます。ただし、ブロッキングに BSA を使用する場合は、グレードによってはバックグラウンドを引き起こす不純物（ウシ IgG, 脂肪など）を含んでいるおそれがありますので、免疫組織染色用 BSA (#SP-5050, p.131 参照) をお使い下さい。

C



① ビオチン標識二次抗体と内在性イムノグロブリン、または他の組織タンパク質の間で、交差反応が生じている可能性があります。使用する動物組織と一次抗体の免疫動物が同じ、または近縁の場合に起こります。

⇒ 組織切片と同じ動物種から得た正常血清を 2% またはそれ以上になるようにビオチン標識二次抗体の希釈液に加えて下さい。または、ビオチン標識二次抗体の濃度を下げて下さい。

② ビオチン標識二次抗体が非特異的に組織に結合している可能性があります。

⇒ 2% 免疫組織染色用 BSA (#SP-5050), 脱脂粉乳, ゼラチン, または 0.1% 界面活性剤などを含んだブロッキング試薬を使用して下さい。

③ 誤った動物種のブロッキング血清を使用しているおそれがあります。

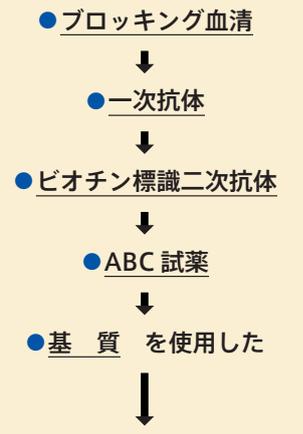
⇒ ビオチン標識二次抗体を作製した動物と同じ動物種から得た血清を使用して下さい。

**注：卵白タンパク質は使用しないで下さい。**

卵白や卵白由来の製品を、スライドのコーティング、バッファの希釈、組織のブロッキングなどの用途で使用した場合、少量のアビジンが存在していると、ビオチン標識二次抗体がアビジンと結合し、非特異的な染色を引き起こす可能性があります。

⇒ VECTABOND reagent (#SP-1800, p.163 参照) を使用して下さい。

D



① 一次抗体が過剰であるおそれがあります。一次抗体の濃度は、バックグラウンドが低く、鮮明で特異的な染色結果が得られる濃度にとどめて下さい。  
⇒ 一次抗体の濃度を下げて下さい。

② 一次抗体が目的抗原以外のエピトープと交差反応している可能性や、非特異的に結合している可能性があります。

⇒ 正常血清, BSA, 脱脂粉乳, ゼラチン, または界面活性剤を一次抗体の希釈液へ加えて下さい。  
⇒ 一次抗体の由来や動物種を変えて下さい。

③ 一次抗体の希釈液に、塩化ナトリウムが含まれていない、または濃度が低い可能性があります。

⇒ 非特異的な結合をブロックするため、一次抗体の希釈液には十分なナトリウム塩が含まれるようにして下さい。一般的には希釈液に、0.15 M (0.9%) ~ 0.6 M の塩化ナトリウムを加えます。

④ 組織切片に小さな、無定形の点のような染色が生じた際は、一次抗体が変性しイムノグロブリンの沈殿物が生じている可能性があります。

⇒ 一次抗体を遠心分離し、上清を使用して下さい。

⑤ 操作中に組織切片を乾燥させた可能性があります。

⇒ 操作中のすべてのステップで、組織切片を湿った状態に維持して下さい。

## 事例 2 : 染色が弱い、または全く染色されない場合

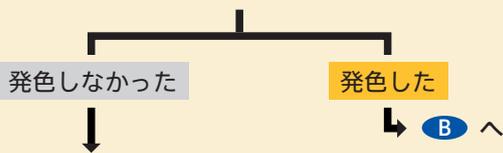
### A : 酵素 / 基質

#### ●ペルオキシダーゼ基質を使用している場合

1~2 滴の ABC 試薬を 1 ml の DAB, VECTOR VIP, VECTOR NovaRED, または VECTOR SG 基質溶液に加えて下さい。溶液の色が、5 秒以内に変わるはずです。

#### ●ペルオキシダーゼ以外の基質を使用している場合

ニトロセルロースメンブレンの小片に ABC 試薬を 1 滴加え、直ちにこのニトロセルロース片を基質溶液に浸して下さい。ABC 試薬を滴下した箇所に、発色スポットが現れるはずです。



①使用した水にペルオキシダーゼの阻害物質が含まれている可能性があります。使用する水の電気伝導度が低い場合でも、ペルオキシダーゼ反応は鋭敏に影響を受けます。

⇒ **基質溶液の調製には、脱イオン水ではなく蒸留水を使用して下さい。**

② **基質バッファーの pH をチェックして下さい。** 基質ごとに至適 pH は異なります。また、基質溶液の調製には、使用直前に希釈した過酸化水素を使用して下さい。過酸化水素の最終濃度は約 0.01% にして下さい。なお、基質の調製は、よく洗浄されたガラス器具を使用して下さい。塩素や洗浄剤などの残留物により、ペルオキシダーゼ反応が阻害される可能性があります。基質は用時調製して下さい。

### B : 一次抗体

①一次抗体が適切な濃度であり、力価が低下していないことを確認して下さい。保存期間が長く、抗体力価が落ちている場合には、適切な染色を得るために一次抗体の濃度を高くする必要があります。抗体の凍結 / 融解の繰り返しなどの操作は、力価の低下または失活を引き起こします（特にモノクローナル抗体に関しては影響大）。一方、抗体濃度が高い場合も染色強度の低下を引き起こす可能性があります。

⇒ **これまでの実験で染色された組織切片（ポジティブコントロール）を用いることで、抗体の活性をテストすることができます。** ポジティブコントロールが染色されたにもかかわらず、今回の組織切片が染色されなかった場合は、p.27 の **注意事項** をご参照下さい。

②一次抗体の希釈液の pH が適切でない場合は、抗原抗体反応が弱まる可能性があります。

⇒ **希釈液の pH を確認して下さい。** 一般的には、pH 7.0~8.2 の TBS または PBS が用いられます。

③一次抗体が認識する抗原が溶液中にも存在する場合、一次抗体が組織切片でなく、溶液中の抗原を優先して認識する可能性があります。一般的に使用される添加物（正常血清、FBS（ウシ胎児血清）、脱脂粉乳）には、一次抗体と結合しうる抗原濃度を有している可能性があります。

⇒ **抗体を希釈する際には、抗原が混入しないように注意して下さい。**

①~③のチェックを行っても染色されない

→ **C** へ

## C: ビオチン標識二次抗体

- ① ビオチン標識二次抗体を過度に希釈した場合は、染色強度が低下する可能性があります。  
⇒ 一般的には、1 : 200 から 1 : 500 の希釈率が最適な染色をもたらします。
- ② 二次抗体の希釈溶液中にわずかでも中和抗体が含まれると、染色強度の低下を引き起こします。例えば、ビオチン標識した抗マウス IgG をマウス血清で希釈しないで下さい。マウス血清中のイムノグロブリンがビオチン標識抗マウス抗体に結合し、二次抗体と一次抗体の結合を妨げます。  
⇒ 混入した中和抗体を反応系から除去して下さい。
- ③ ビオチン標識抗体の特異性が正しくない場合、染色されません。ビオチン標識抗体は、一次抗体を作製した動物種イムノグロブリンに特異的である必要があります。  
⇒ 適切なビオチン標識抗体を使用して下さい。例えば、免疫動物がウサギの一次抗体の場合には、ビオチン標識抗ウサギ IgG (二次抗体) を使用します。
- ①～③上記を行っても染色されない

→ **注意事項** ←

## 注意事項

免疫組織化学染色の操作を最適化するための注意事項

### ● 操作法のチェック

- ① 同量の試薬 A と試薬 B を、規定量のバッファーに加えて下さい。試薬 A と試薬 B を混合した後の希釈はしないで下さい。不活性な複合体を生じるおそれがあります。
- ② ビオチンを含むおそれがある物質を ABC 試薬の希釈液に加えないで下さい。血清、脱脂粉乳、培養液は、一般にビオチンを含んでいると考えられます。
- ③ BSA はグレードによって、アビジン/ビオチン間相互作用を阻害する場合があります。フラクシオン V グレードの BSA は使用しないで下さい。BSA を加える場合には、免疫組織染色用 BSA (#SP-5050) を使用して下さい。

### ● ブロッキングのチェック

ブロッキング血清を採取した動物の個体の中には、目的の抗原に対する抗体を産生している可能性を持つものがあります。この抗体が存在する場合には、目的抗原と結合して本来の一次抗体の結合を阻害するおそれがあります。

⇒ キット構成成分以外のブロッキング試薬を使用する場合は免疫組織染色用 BSA (#SP-5050)、ゼラチン、FBS (ウシ胎児血清)、脱脂粉乳や 1% 界面活性剤などを使用して下さい。

### ● 固定のチェック

抗原が保持され、また検出試薬と反応できるよう、切片の調製が適切であったか確認して下さい。固定によりマスクされた抗原を回復させるため、加熱やプロテアーゼ消化、Antigen Unmasking Solution (#H-3300, #H-3301, p.22 参照) などを用いて、抗原の賦活処理を行って下さい。

### ● 対比染色剤/封入剤

酵素反応生成物の中には、通常、封入剤に使用される非水溶性溶媒 (アルコール、キシレン、その他有機溶媒など) に溶解するものがあります。酵素反応生成物が、使用する対比染色や封入剤に適しているかどうか確認し適切な試薬を用いるようにして下さい。(対応表は p.100, 102, 110 参照)

### 3. M.O.M. Immunodetection キットを用いた組織染色法

製品情報 (価格など) p.98 参照

M.O.M. キットは、マウス組織中の抗原をマウス一次モノクローナル、またはポリクローナル抗体を用いて特異的に検出するためのキットです。マウス組織中の抗原をマウス一次抗体を用いて免疫組織化学的に検出する場合、抗マウス二次抗体が内在性のマウスイムノグロブリンも認識するために、高いバックグラウンドが生じ、染色像が不鮮明になってしまいます。本キットでは特殊なブロッキング試薬を用いることで、マウス組織をマウス抗体を用いて、ABC法 (発色または蛍光法) による免疫組織染色ができます。

内在性マウスイムノグロブリンの存在は、これまで紹介した VECTASTAIN ABC キットシリーズを用いて、2種類のコントロールスライドの染色パターンを比較することによって確認できます (下表参照)。

| チェック項目            | スライド A | スライド B |
|-------------------|--------|--------|
| 内在性酵素活性のブロッキング    | ○      | ○      |
| アビジン/ビオチンブロッキング操作 | ○      | ○      |
| マウス一次抗体           | ×      | ×      |
| 抗マウス IgG 二次抗体     | ×      | ○      |
| 検出システム (酵素/蛍光)    | ○      | ○      |
| 酵素基質              | ○      | ○      |

○=実施, 添加  
×=未処理, 添加せず

各種ブロッキングを実施しても

非特異染色がコントロールスライド B のみに認められる  
または  
非特異染色がコントロールスライド A より B に高く認められる



このような結果の場合には二次抗体が組織中の内在性マウスイムノグロブリンに結合していると思われます。バックグラウンドを防ぐためには、マウス組織をマウス一次抗体を用いて染色する、**VECTOR Mouse on Mouse (M.O.M.) キット**をご使用下さい。

M.O.M. キットには検出法の違いにより**ペルオキシダーゼを用いた染色キット (#PK-2200, 検出試薬: VECTASTAIN ABC reagent)**と**フルオレセイン標識アビジンを用いた染色キット (#FMK-2201, 検出試薬: Fluorescein avidin DCS)**の二種類があります。更に検出試薬を含まず、検出方法を自由に選択して使用できる**Basic Kit (#BMK-2202)**もあります。

※M.O.M. キットには、ABC キットの他にも酵素マイクロポリマー ImmPRESS を用いた製品もあります。

#### ペルオキシダーゼ検出法 (#PK-2200)

##### キットに含まれる試薬

|                             |        |
|-----------------------------|--------|
| ・ M.O.M. タンパク質濃縮液*          | 6 ml   |
| ・ M.O.M. マウス Ig ブロッキング試薬*   | 1 ml   |
| ・ M.O.M. ビオチン標識抗マウス IgG 試薬* | 0.1 ml |
| ・ VECTASTAIN ABC 試薬         |        |
| 試薬 A (アビジン DH) :            | 1 ml   |
| 試薬 B (ビオチン標識ペルオキシダーゼ H) :   | 1 ml   |

※1 キットで約 25 ml の反応溶液を調製することができ、約 250 枚の組織切片を染色できます。

※\*印製品は、VECTOR M.O.M. Immunodetection Basic Kit (#BMK-2202) として販売しています。また、M.O.M. マウス Ig ブロッキング試薬 (#MKB-2213) は単品でも購入可能ですが、他の試薬との併用により、最適な結果が得られます。

##### 反応溶液 (Working solution) の調製法

- 1) M.O.M. 希釈溶液 :  
PBS または TBS 7.5 ml\* にタンパク質濃縮ストック溶液 600 µl を加えます。
- 2) M.O.M. マウス Ig ブロッキング試薬 :  
PBS または TBS 2.5 ml に、ストック溶液 2 滴を加えます。
- 3) M.O.M. ビオチン標識抗マウス IgG 試薬 :  
上記で調製した M.O.M. 希釈溶液 2.5 ml にストック溶液 10 µl を加えます。
- 4) VECTASTAIN ABC 試薬 :  
PBS または TBS 2.5 ml に試薬 A を 2 滴加えて混合し、次いで試薬 B を 2 滴加え、混合します。

**VECTASTAIN ABC 試薬は使用する 30 分前に調製して下さい。**

※1 滴は約 45 µl です。

※PBS : 10 mM sodium phosphate,  
150 mM NaCl, pH 7.4~7.8

※TBS : 50 mM Tris-0.15 M NaCl,  
pH 7.5~7.8

\*M.O.M. 反応液 7.5 ml は、組織切片染色法のステップ 9, 10 と 12 で使用するのに十分な量です。

## 基 質

ペルオキシダーゼ基質キットの詳細は p.39 をご覧ください。

## 組織切片染色法

パラフィン包埋切片及び凍結切片のどちらも簡単に効率よく染色できます。

- 1. パラフィン切片の場合：**組織切片をキシレンやその他の脱パラフィン剤で処理したのち、アルコール濃度を段階的に下げて水和します。  
**凍結切片の場合：**アセトンまたは目的の抗原に適した固定液で組織切片を固定し、風乾します。
2. 蒸留水で5分間洗浄します。
3. 必要に応じて、Antigen Unmasking Solution (#H-3300, p.22 参照) などを用い、抗原を賦活化します。
4. 内在性ペルオキシダーゼの不活化が必要な場合は、以下のいずれかの方法で不活化します。
  - ・ BLOXALL (#SP-6000, p.23 参照) で10分間
  - ・ 3% 過酸化水素水で5分間 (パラフィン切片の場合)
  - ・ 0.3% 正常血清を含む PBS で調製した 0.3% 過酸化水素溶液で5分間 (凍結切片の場合)内在性ペルオキシダーゼ活性が問題とならない場合は、このステップは省略して下さい。
5. PBS または TBS で2分間ずつ2回洗浄します。
6. 内在性ビオチン活性を除く必要がある場合は、Avidin / Biotin Blocking Kit (#SP-2001, p.130 参照) などを使って、ブロッキングを行います。内在するこれらの活性が問題とならない場合はこのステップは省略して下さい。
7. 調製した M.O.M. マウス Ig ブロッキング試薬を滴下し1時間反応させます。
8. PBS または TBS で2分間ずつ2回洗浄します。
9. M.O.M. 希釈液を滴下し5分間反応させます。
10. 切片を傾けて余分な M.O.M. 希釈液を除去します。M.O.M. 希釈液で適当な濃度に希釈した一次抗体を滴下し、30分間反応させます。
11. PBS または TBS で2分間ずつ2回洗浄します。
12. M.O.M. ビオチン標識抗マウス IgG 抗体を滴下し、10分間反応させます。
13. PBS または TBS で2分間ずつ2回洗浄します。
14. VECTASTAIN *ABC* 試薬を滴下し、5分間反応させます。
15. PBS または TBS で切片を5分間ずつ2回洗浄します。
16. ペルオキシダーゼ基質溶液を滴下し、適切な染色強度が得られるまで反応させます。用いる基質により反応時間が異なります。詳細は p.48~49 をご覧ください。

### MEMO

染色操作のステップ 8.~12. では、反応時間を正確に守ることが大切です。反応時間が長いと、高いバックグラウンドが生じる可能性があります。

## 蛍光検出法 (#FMK-2201)

### キットに含まれる試薬

|                               |        |
|-------------------------------|--------|
| ・ M.O.M. タンパク質濃縮液* :          | 6 ml   |
| ・ M.O.M. マウス Ig ブロッキング試薬* :   | 1 ml   |
| ・ M.O.M. ビオチン標識抗マウス IgG 試薬* : | 0.1 ml |
| ・ フルオレセイン標識アビジン DCS :         | 0.4 ml |

※1 キットで約 25 ml の反応溶液を調製することができ、約 250 枚の組織切片を染色できます。

※\*印製品は、VECTOR M.O.M. Immunodetection Basic Kit (#BMK-2202) として販売しています。また、M.O.M. ビオチン標識抗マウス IgG 試薬 (#MKB-2225), M.O.M. マウス Ig ブロッキング試薬 (#MKB-2213) は単品でも購入可能ですが、他の試薬との併用により、最適な結果が得られません。

### 反応溶液 (Working solutions) の調製法

- 1) M.O.M. マウス Ig ブロッキング試薬 :  
PBS または TBS 2.5 ml に、ストック溶液 2 滴を加えます。
- 2) M.O.M. 希釈溶液 :  
PBS または TBS 7.5 ml\* にタンパク質濃縮ストック液 600 µl を加えます。
- 3) M.O.M. ビオチン標識抗マウス IgG 試薬 :  
上記調製 M.O.M. 希釈溶液 2.5 ml にストック溶液 10 µl を加えます。
- 4) フルオレセイン標識アビジン DCS :  
PBS または TBS 2.5 ml にストック溶液 40 µl を加えます。

\* M.O.M. 反応液 (7.5 ml) は、下記の組織切片染色法ステップ 7, 8 と 10 で使用するのに十分な量です。

### 組織切片染色法

- 1.~6. 前項「ペルオキシダーゼ検出法」の組織切片染色ステップ 1.~6. に従って下さい。
7. 調製した M.O.M. マウス Ig ブロッキング試薬を滴下し、1時間反応させます。
8. PBS または TBS で2分間ずつ2回洗浄します。
9. M.O.M. 希釈液を滴下し、5分間反応させます。
10. 切片を傾けて過剰な M.O.M. 希釈液を除去します。M.O.M. 希釈液で適当に希釈した一次抗体を滴下し30分間反応させます。
11. PBS または TBS で2分間ずつ2回洗浄します。
12. 調製した M.O.M. ビオチン標識抗マウス IgG 抗体を滴下し、10分間反応させます。
13. PBS または TBS で切片を2分間ずつ2回洗浄します。
14. 調製したフルオレセイン標識アビジン DCS を滴下し、5分間反応させます。
15. PBS または TBS で5分間ずつ2回洗浄します。
16. VECTASHIELD Mounting Medium (#H-1000, p.170 参照) などの蛍光染色用封入剤で封入します。

## 蛍光二重染色法

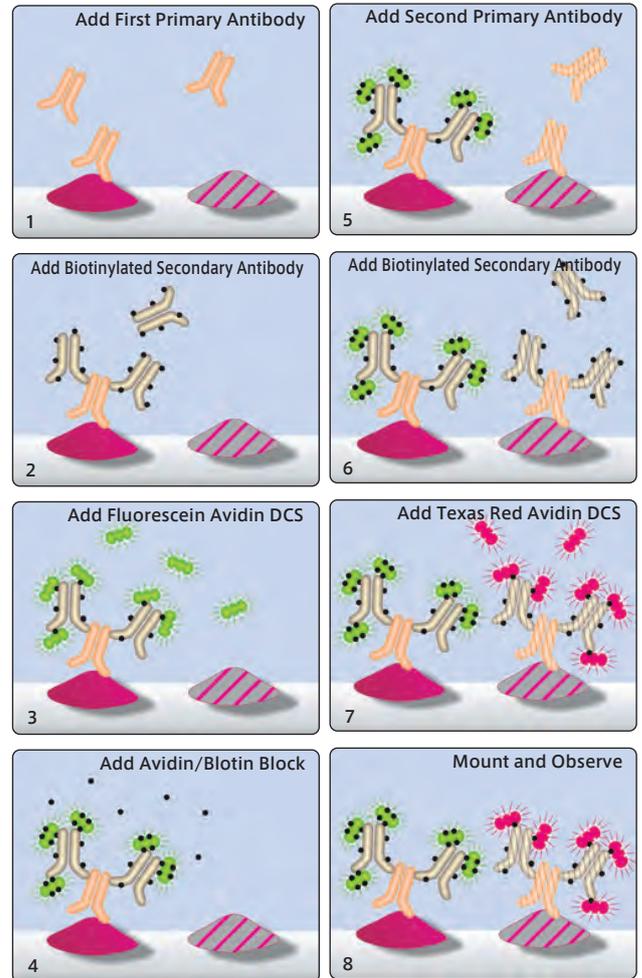
### ●第1の抗原検出

1. マウス組織切片を適切な方法で固定します。
2. 切片を風乾します。
3. PBS または TBS で 2 分間ずつ 2 回洗浄します。
4. 必要に応じて内在性ビオチン活性を除去して下さい。Avidin / Biotin Blocking Kit (#SP-2001, p.130 参照) などを使って、ブロッキングを行います。
5. 調製した M.O.M. マウス Ig ブロッキング試薬を滴下し、1 時間反応させます。
6. PBS または TBS で 2 分間ずつ 2 回洗浄します。
7. 調製した M.O.M. 希釈液を滴下し、5 分間反応させます。
8. 切片を傾けて過剰な M.O.M. 希釈液を除去し、M.O.M. 希釈液で希釈した第 1 の一次抗体 (マウスモノクローナル抗体) を滴下し、30 分間反応させます。
9. PBS または TBS で 2 分間ずつ 2 回洗浄します。
10. 調製した M.O.M. ビオチン標識抗マウス IgG 抗体を滴下し、10 分間反応させます。
11. PBS または TBS で 2 分間ずつ 2 回洗浄します。
12. 蛍光標識アビジン DCS\* を滴下し、5 分間反応させます。
13. PBS または TBS で 5 分間ずつ 2 回洗浄します。

### ●第2の抗原検出

1. 内在性ビオチン活性を除去して下さい (ここでは必ず行って下さい)。第 1 の抗原検出のステップ 4 に従って下さい。
2. 調製した M.O.M. マウス Ig ブロッキング試薬を滴下し、1 時間反応させます。
3. PBS または TBS で 2 分間ずつ 2 回洗浄します。
4. 調製した M.O.M. 希釈液を滴下し、5 分間反応させます。
5. 切片から過剰な M.O.M. 希釈液を除去し、M.O.M. 希釈液で希釈した第 2 の一次抗体 (マウスモノクローナル抗体) を滴下し、30 分間反応させます。
6. PBS または TBS で 2 分間ずつ 2 回洗浄します。
7. 調製した M.O.M. ビオチン標識抗マウス IgG 抗体を滴下し、10 分間反応させます。
8. PBS または TBS で 2 分間ずつ 2 回洗浄します。
9. 第 1 の抗原検出とは異なる蛍光標識アビジン DCS\* を滴下し、5 分間反応させます。
10. PBS または TBS で 5 分間ずつ 2 回洗浄します。
11. VECTASHIELD Mounting Medium (#H-1000, p.170 参照) などの封入剤で封入します。

\* 蛍光二重染色を行う際には、キットに含まれるフルオレセイン標識アビジン DCS と異なる蛍光試薬で標識されたアビジン DCS (例: Texas Red 標識アビジン DCS (#A-2016) など) が必要です。



### 蛍光検出キット使用上の注意

1. ホルマリンなどのアルデヒドで固定した組織は自家蛍光を持つ傾向があり、特異的な蛍光シグナルとの区別が難しくなる可能性があります。
2. 検出感度は、ビオチン標識抗アビジン D 抗体 (#BA-0300) とフルオレセイン標識アビジン DCS を組み合わせて用いることによって、更に高めることができます。
3. フルオレセイン以外の蛍光標識アビジン DCS (別売り) を使用することも可能です。ローダミン標識アビジン DCS (#A-2012) または Texas Red 標識アビジン DCS (#A-2016) があります (p.41 参照)。

### ● MEMO ●

染色操作のステップのうち、一次抗体反応～二次抗体反応では、時間を正確に守ることが大切です。反応時間を長くすると、バックグラウンドが高くなる場合があります。反応時間を延長する場合には、M.O.M. マウス Ig ブロッキング試薬の効果を確認するために、適当なネガティブコントロール切片を同時に染色して下さい。

## M.O.M. キット使用上の注意

VECTASTAIN ABC キット使用上の注意 (p.20~) もあわせてご覧ください。

1. 内在性イムノグロブリン量は、組織の種類、固定法などのさまざまな要因によって異なるため、試料に応じて使用条件を最適化する必要があります。例えば M.O.M. ビオチン標識抗マウス IgG 試薬の濃度を下げる、M.O.M. マウス Ig ブロッキング試薬の濃度を交える、マウス Ig ブロッキング試薬との反応時間を延長するなどの処理により、良好な結果が得られることがあります。
2. バックグラウンドの原因が、必ずしも組織切片に存在する内在性マウスイムノグロブリンによるものとは限りません。他の要因によるバックグラウンドの可能性を除外するために、適当なネガティブコントロール切片を同時に染色して処理して下さい。
3. すべてのマウスモノクローナル抗体やポリクローナル抗体が、マウス由来の抗原を認識できるわけではありません。マウス以外の動物種の切片で染色を行うことで、一次抗体の信頼性を確認できます。

## M.O.M. キット トラブルシューティングガイド

### バックグラウンドの原因が、内在性マウスイムノグロブリンではない場合

場合によっては内在性マウスイムノグロブリン以外の要因によっても非特異染色は起こります。どの試薬がバックグラウンドに影響しているかを検討するために適切なコントロール染色が必要です。コントロールの染色結果に基づいて、次の操作が必要になる場合があります。

- ① Avidin / Biotin Blocking Kit (#SP-2001, p.130 参照) などを用いて内在性ビオチンブロッキングを行って下さい。
- ② 酵素検出法を用いた際には内在性酵素活性のブロッキングを行って下さい (p.23 参照)。

もし一次抗体を加えただけでバックグラウンドが見られる場合、一次抗体の特異性または反応液に問題があると考えられます。新しいアプリケーションや組織を用いる際には、プロトコルのチェックと最適化を行う必要があります (p.22~参照)。

## M.O.M. キットの使用条件を変更する必要がある場合

### ●M.O.M. 希釈液

M.O.M. は、非特異的タンパク質相互作用により生じるバックグラウンド染色を最小限にするために特別に調製されていますが、それでも非特異的な染色像を生じた場合には、タンパク質濃縮液に 0.1% 界面活性剤 (Tween 20, Triton X-100 など) を加えると、結果が改善される場合があります。

ほとんどのマウス組織では、VECTOR M.O.M. プロトコルに記載された希釈率と反応時間が、内在性マウス Ig によるバックグラウンドの減少に有効です。それでもバックグラウンドが検出される場合には、M.O.M. マウス Ig ブロッキング試薬または M.O.M. ビオチン標識抗マウス IgG 試薬の使用条件を検討して下さい。

### ●M.O.M. マウス Ig ブロッキング試薬

試薬の濃度および反応時間を変更した方が良いケースもあります。場合によっては、少量の試薬を用いた方が効果的な場合もあります。例えば試薬 2 滴をバッファー 2.5 ml で希釈する代わりに、試薬 2 滴をバッファー 5 ml で希釈するように変えた方が、バックグラウンド染色を抑える場合があります。

一方、Ig ブロッキング試薬の濃度を高くする (2.5 ml のバッファーに 3 または 4 滴) ことがより効果的な場合もあります。またはブロッキング時間を延長してみてください。1 : 10 (2.5 ml のバッファーに 5 滴) に希釈して 4°C で一晩反応させ、その後室温で 30 分間反応させる方法も効果的です。

### ●M.O.M. ビオチン標識抗マウス IgG 試薬

濃度を下げるために、例えば試薬 7.0 μl を 2.5 ml のバッファーに加えて希釈溶液を調製します。特異的な染色強度にはあまり影響を与えず、バックグラウンド染色を抑えることができます。

**注:** ここで紹介した条件は、M.O.M. を最適化するためのものです。反応/洗浄時間を延長する場合には、適切なネガティブコントロールを用いて M.O.M. Ig ブロッキング試薬の有効性が低下していないかを確認して下さい。

**注:** p.20~の「VECTASTAIN ABC キット使用上の注意」もご参照下さい。

# 4. ImmPRESS Reagent(酵素マイクロポリマー)を用いた組織染色法

## ImmPRESS Reagent とは

図解操作マニュアル p.45 参照

製品情報(価格など) p.68, p.84 参照

ImmPRESS Reagent は、ABC システムとは異なる VECTOR 社独自の酵素マイクロポリマーで、ペルオキシダーゼ (HRP) またはアルカリホスファターゼ (AP) と二次抗体を結合させた新しい免疫組織染色システムです。わずか 2 ステップで、高感度かつ低バックグラウンドの免疫組織染色が行えます。巨大デキストランや高分子ポリマーを酵素ポリマー骨格として用いた従来のシステムに比べ、ImmPRESS Reagent は標的となる一次抗体に容易に結合するため非特異的結合が低く抑えられます。

様々な一次抗体に対応する製品があり、マウスおよびウサギいずれの一次抗体にも対応できるユニバーサルタイプの製品もあります。いずれの抗体もアフィニティ精製済みです。滴下瓶に入っており、調製済みのため希釈する必要はありません。50 ml で約 250~500 枚の切片を染色できます。

### ペルオキシダーゼ (HRP) 用

| 二次抗体の種類                  | 商品コード                 |
|--------------------------|-----------------------|
| Anti-Goat Ig             | MP-7405 <sup>*1</sup> |
| Anti-Mouse Ig            | MP-7402 <sup>*1</sup> |
|                          | MP-7452 <sup>*2</sup> |
| Anti-Mouse Ig (ラット吸収処理済) | MP-7422 <sup>*1</sup> |
| Anti-Mouse / Rabbit Ig   | MP-7500 <sup>*1</sup> |
| Anti-Rabbit Ig           | MP-7401 <sup>*1</sup> |
|                          | MP-7451 <sup>*2</sup> |
| Anti-Rat Ig              | MP-7404 <sup>*2</sup> |
| Anti-Rat Ig (マウス吸収処理済)   | MP-7444 <sup>*2</sup> |

### アルカリホスファターゼ (AP) 用

| 二次抗体の種類                | 商品コード                 |
|------------------------|-----------------------|
| Anti-Mouse Ig          | MP-5405 <sup>*1</sup> |
| Anti-Goat              | MP-7405 <sup>*1</sup> |
| Anti-Rabbit Ig         | MP-5401 <sup>*1</sup> |
| Anti-Rat Ig            | MP-5404 <sup>*1</sup> |
| Anti-Rat Ig (マウス吸収処理済) | MP-5444 <sup>*1</sup> |

\*1 ブロッキング用正常ウマ血清添付

\*2 ブロッキング用正常ヤギ血清添付

## 製品に含まれる試薬

- ・ ImmPRESS Reagent
- ・ ブロッキング用 2.5% 正常ウマ (またはヤギ) 血清

## 製品以外に必要な試薬

- ・ 一次抗体
- ・ バッファー
- ・ ペルオキシダーゼ/アルカリホスファターゼ基質 (p.38~参照)

## ImmPRESS Reagent を用いた染色法 (ペルオキシダーゼの例)

### 組織切片染色法

1. **パラフィン切片の場合**：組織切片をキシレンやその他の脱パラフィン剤で処理したのち、アルコール濃度を段階的に下げて水和します。  
**凍結切片の場合**：アセトンまたは目的の抗原に適した固定液で組織切片を固定し、風乾します。
2. 蒸留水で 5 分間洗浄します。
3. 必要に応じて、Antigen Unmasking Solution (#H-3300, #H-3301, p.22 参照) などを用い、抗原を賦活化します。
4. 内在性ペルオキシダーゼの不活化が必要な場合は、以下のいずれかの方法で不活化します。
  - ・ BLOXALL (#SP-6000, p.23 参照) で 10 分間
  - ・ 3% 過酸化水素水で 5 分間 (パラフィン切片の場合)
  - ・ 0.3% 正常血清を含む PBS で調製した 0.3% 過酸化水素溶液で 5 分間 (凍結切片の場合)内在性ペルオキシダーゼ活性が問題とならない場合は、このステップは省略して下さい。
5. バッファー (PBS または TBS など) で 5 分間洗浄します。
6. 調製済みブロッキング用正常血清またはお好みのブロッキング試薬を滴下し、20 分間反応させます。
7. 適切なバッファーで希釈した一次抗体を滴下し、反応させます。
8. バッファーで 5 分間ずつ 2 回以上洗浄します。
9. ImmPRESS Reagent を滴下し、30 分間反応させます。
10. バッファーで 5 分間洗浄します。
11. 基質溶液を滴下し、適切な染色強度が得られるまで反応させます (用いる基質により反応時間が異なります。詳細は p.48~49 をご覧下さい)。
12. 蒸留水で洗浄します。
13. 対比染色後、脱水<sup>\*3</sup>・透徹 (パラフィン包埋切片の場合) / 洗浄 (凍結切片の場合)、封入します。

\*3 基質により脱水しない場合もあります。

## パラフィン包埋切片の前処理方法

1. 組織切片をキシレンその他の脱パラフィン試薬で脱パラフィン化したのち、アルコール濃度を段階的に下げて水和します。
2. 蒸留水で 5 分間洗浄します。
3. 内在性ペルオキシダーゼ活性を除去する必要がある場合は、適切な方法で不活性化します（前ページ参照）。内在性ペルオキシダーゼ活性が問題とならない場合は、このステップは省略して下さい。
4. バッファー（PBS または TBS など）で 3 分間ずつ 2 回洗浄します。

## ●第 1 の抗原検出

1. 調製済みブロッキング用正常血清を滴下し、20 分間反応させます。
2. 適切なバッファー（2.5% 正常血清または 0.1% BSA<sup>\*1</sup> を含む）で希釈した第 1 の一次抗体を滴下し、反応させます。
3. バッファーで 5 分間洗浄します。
4. ImmPRESS Reagent を滴下し、30 分間反応させます。
5. バッファーで 5 分間洗浄します。
6. 基質溶液を滴下し、適切な染色強度が得られるまで反応させます（用いる基質により反応時間が異なります）。
7. バッファーで洗浄します。

## ●第 2 の抗原検出

1. 調製済みブロッキング用正常血清を滴下し、20 分間反応させます。
2. 適切なバッファー（2.5% 正常血清または 0.1% BSA<sup>\*1</sup> を含む）で希釈した第 2 の一次抗体を滴下し、反応させます。
3. バッファーで 5 分間洗浄します。
4. ImmPRESS Reagent を滴下し、30 分間反応させます。
5. バッファーで 5 分間洗浄します。
6. 第 1 の抗原検出とは異なる基質溶液を滴下し、適切な染色強度が得られるまで反応させます（用いる基質により反応時間が異なります）。
7. バッファーで 5 分間洗浄します。
8. 対比染色後、脱水・透徹、封入します<sup>\*2</sup>。

\*1 BSA は免疫組織染色用 BSA（#SP-5050, p.131 参照）をご使用下さい。

\*2 基質により脱水しない場合もあります。

### ● MEMO ●

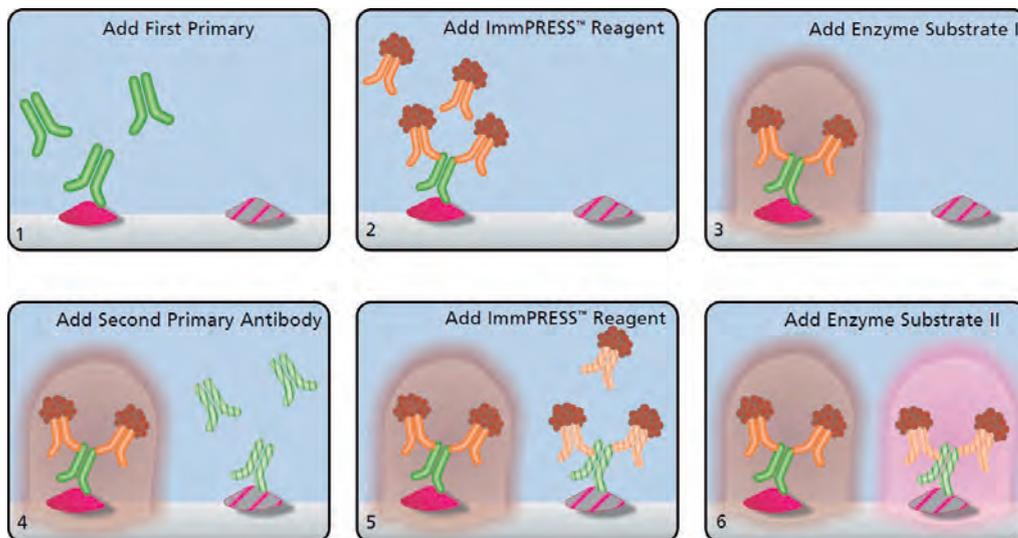
必要に応じて Antigen Unmasking Solution（#H-3300, #H-3301）などを用い、抗原を賦活化させて下さい（p.22 参照）。

## M.O.M ImmPRESS Peroxidase Polymer キット

ImmPRESS Reagent を用いて検出する M.O.M キットです（p.71 参照）。

※詳細なプロトコルについては、当社テクニカルサポート（試薬担当）までお問い合わせ下さい。

二重染色概略図



※HRP と AP の 2 種類の酵素ポリマーを 1 バイアルに混合済みで、ワンステップで二重染色ができる ImmPRESS Duet Reagent もあります。詳細は p.114 をご覧下さい。

## トラブルシューティングガイド

ImmPRESS 酵素ポリマー免疫染色システムは最適な染色結果が得られるように、様々な免疫組織化学アプリケーションを用いて厳密な品質検査が実施されており、長期間の保存においても品質を保持することを確認済みです。しかし、組織や細胞試料によっては、製品の品質とは異なる要因により、バックグラウンド染色が生じたり、特異的染色が弱まってしまうケースもあり得ます（例：固定法や抗原賦活化の条件、内在性の組織成分など）。

バックグラウンド染色や染色が弱いといった結果が得られた場合、すべての原因を特定することは困難で、問題解決には多大な時間と労力が必要となります。以下のトラブルシューティングガイドではImmPRESS Reagentを用いて免疫組織/細胞染色を行う際に生じる問題に対し、最も一般的な解決方法を解説しています。

### 事例 1：高いバックグラウンド染色が生じた場合

A ~ C の条件でコントロール実験を行い、問題点を検証して下さい。

A

● 基質のみ

染色される場合

染色されない場合

→ B へ

内在性酵素による発色反応が引き起こされている可能性があります。

① 全体的にバックグラウンドが高い場合は、組織切片を作製する際、内在性酵素により汚染されている可能性があります。

⇒ 内在性の酵素を適切な方法であらかじめブロッキングして下さい。

内在性酵素活性のブロッキングに関する詳細は p.23 をご覧下さい。

② 染色時間が長くなると、バックグラウンドが高くなる可能性があります。

⇒ 必ず実際の試料と同じ条件で発色反応を実施して下さい。

B

● ブロッキング血清

● ImmPRESS Reagent

● 基質

染色される場合

染色されない場合

→ C へ

① 試料組織の動物種と一次抗体の免疫動物種が同じ場合、内在性イムノグロブリンがImmPRESS Reagentに結合している可能性があります。  
(例：マウス組織切片にマウス一次抗体を使用)

⇒ ・マウス組織切片にマウス一次抗体を使用する場合は、M.O.M. ImmPRESS キット (#MP-2400, p.71 参照) を用いて下さい。

② 試料組織とImmPRESS Reagentの間で交差反応が生じている可能性があります。使用する一次抗体の免疫動物種と試料組織の動物種が近縁の場合に起こりやすくなります。

⇒ ・組織試料の動物種に対して吸収処理済みの試薬を使用して下さい。

・組織試料の動物種由来の正常血清 (>2%) をImmPRESS Reagentに加え、希釈して下さい。

・ブロッキング用試薬として、2% 免疫組織染色用BSA (#SP-5050, p.131 参照)、脱脂粉乳、ゼラチン、0.1% 界面活性剤などを追加で使用して下さい。

4

ImmPRESS Reagent (酵素マイクロポリマー) を用いた組織染色法

免疫染色実験ガイド 2019-2020

③ ImmPRESS Reagent を反応させた後の洗浄が不十分である可能性があります。

⇒ ・洗浄時間を延長し、途中で何度か洗浄バッファーを交換して下さい。

④ 誤った動物種のブロッキング血清を使用している可能性があります。

⇒ ・使用する ImmPRESS Reagent の動物種と同じ動物種由来の血清を使用して下さい。

C

● ブロッキング血清



● 一次抗体



● ImmPRESS Reagent



● 基質 を使用した



適切な染色が得られない場合

① 一次抗体が過剰であるおそれがあります。一次抗体の濃度は、バックグラウンドが低く、鮮明で特異的な染色結果が得られる濃度にとどめて下さい。  
⇒ 一次抗体の濃度を下げて下さい。

② 一次抗体が目的抗原以外のエピトープと交差反応している可能性や、非特異的に結合している可能性があります。  
⇒ 正常血清, BSA, 脱脂粉乳, ゼラチン, または界面活性剤を一次抗体の希釈液へ加えて下さい。  
⇒ 一次抗体の由来や動物種を変えて下さい。

③ 一次抗体の希釈液に、塩が含まれていない、または濃度が低い可能性があります。  
⇒ 非特異的なイオン相互作用をブロックするため、一次抗体の希釈液には十分な塩が含まれるようにして下さい。一般的には希釈液に、0.15 M (0.9%) ~ 0.6 M の塩化ナトリウムを加えます。

④ 組織切片に小さな、無定形の点のような染色が生じた際は、一次抗体が変性シムノグロブリンの沈殿物が生じている可能性があります。  
⇒ 一次抗体を遠心分離し、上清を使用して下さい。

⑤ 操作中に組織切片を乾燥させた可能性があります。  
⇒ 操作中のすべてのステップで、組織切片を湿った状態に維持して下さい。

## 事例 2 : 染色が弱い, または全く染色されない場合

A ~ C のコントロール実験を行い, 問題点を検証して下さい。

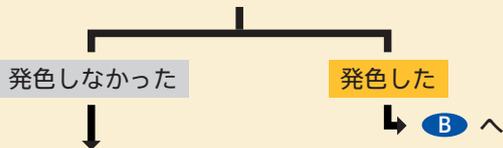
### A : 酵素 / 基質

#### ●ペルオキシダーゼ基質の場合

1~2 滴の ImmPRESS Reagent を 1 ml のペルオキシダーゼ基質溶液に加えて下さい。溶液の色が 5 秒以内に变化するはずです。

#### ●ペルオキシダーゼ以外の基質の場合

ニトロセルロースメンブレンの薄片に ImmPRESS Reagent を 1 滴加え, 直ちにニトロセルロース片を基質溶液に浸して下さい。ImmPRESS Reagent を滴下した箇所に, 発色スポットが現れるはずです。



①使用した水にペルオキシダーゼの阻害物質が含まれている可能性があります。使用する水の電気伝導度が低い場合でも, ペルオキシダーゼ反応は鋭敏に影響を受けます。

⇒ 基質溶液の調製には, 脱イオン水ではなく蒸留水を使用して下さい。

②基質バッファの pH をチェックして下さい。基質ごとに至適 pH は異なります。また, 基質の調製は, よく洗浄されたガラス器具を使用して下さい。塩素や洗浄剤などの残留物により, ペルオキシダーゼ反応が阻害される可能性があります。基質は用時調製して下さい。

### B : 一次抗体

①一次抗体が適切な濃度であり, 力価が低下していないことを確認して下さい。保存期間が長く, 抗体力価が落ちている場合には, 適切な染色を得るために一次抗体の濃度を高くする必要があります。抗体の凍結 / 融解の繰り返しなどの操作は, 力価の低下または失活を引き起こします (特にモノクローナル抗体に関しては影響が大きくなります)。一方, 抗体濃度が高い場合も染色強度の低下を引き起こす可能性があります。

⇒これまでの実験で染色された組織切片 (ポジティブコントロール) を用いることで, 抗体の活性をテストすることができます。ポジティブコントロールが染色されたにもかかわらず, 今回の組織切片が染色されなかった場合は, p.37 の **注意事項** をご参照下さい。

②一次抗体の希釈液の pH が適切でない場合は, 抗原抗体反応が弱まる可能性があります。

⇒希釈液の pH を確認して下さい。一般的には, pH 7.0~8.2 の TBS または PBS が用いられます。

③一次抗体が認識する抗原が溶液中にも存在する場合, 一次抗体が組織切片でなく, 溶液中の抗原を優先して認識する可能性があります。一般的に使用される添加物 (正常血清, FBS : ウシ胎児血清, 脱脂粉乳) は, 一次抗体と結合しうる抗原濃度を有している可能性があります。

⇒抗体を希釈する際には, 抗原が混入しないように注意して下さい。

①~③のチェックを行っても染色されない

⇒ **C** へ

## C : ImmPRESS Reagent

①ImmPRESS Reagent はほとんどのアプリケーションにおいて Ready-to-use (R.T.U.) で使用できるよう最適な濃度に調製されています。酵素標識二次抗体は過度に希釈してしまうと染色強度が低下します。

⇒ 希釈する場合、通常は 1 : 200 から 1 : 500 程度の希釈比で最適な染色結果が得られるはずです。

②溶液中にわずかでも中和抗体などが含まれると、染色強度が低下します。

例えば、抗マウス IgG ImmPRESS Reagent をマウス血清で希釈しないで下さい。マウス血清中のイムノグロブリンが、抗マウス IgG ImmPRESS Reagent に結合し、一次抗体との結合を妨げます。

⇒ 中和抗体を反応系から除去して下さい。

③ ImmPRESS Reagent の動物種が誤っている場合、染色されません。一次抗体の免疫動物に特異的な ImmPRESS Reagent を使用する必要があります。

例えば、抗ウサギ IgG ImmPRESS Reagent は一次抗体の免疫動物がウサギの場合に使用します。

⇒ 適切な ImmPRESS Reagent を使用して下さい。

上記①～③を行っても染色されない

→ [注意事項](#) へ

## 注意事項

### ● ブロッキングのチェック

ブロッキング血清を採取した動物の個体の中には、目的の抗原に対する抗体を産生している可能性を持つものがあります。この抗体が存在する場合には、目的抗原と結合して本来の一次抗体の結合を阻害するおそれがあります。

⇒ キット構成成分以外のブロッキング血清を使用する場合は免疫組織染色用 BSA (#SP-5050, p.131 参照)、ゼラチン、FBS (ウシ胎児血清)、脱脂粉乳などのブロッキングタンパク質や 1% 界面活性剤などを使用して下さい。

### ● 固定のチェック

抗原が保持され、また検出試薬と反応できるよう、切片の調製が適切であったか確認して下さい。

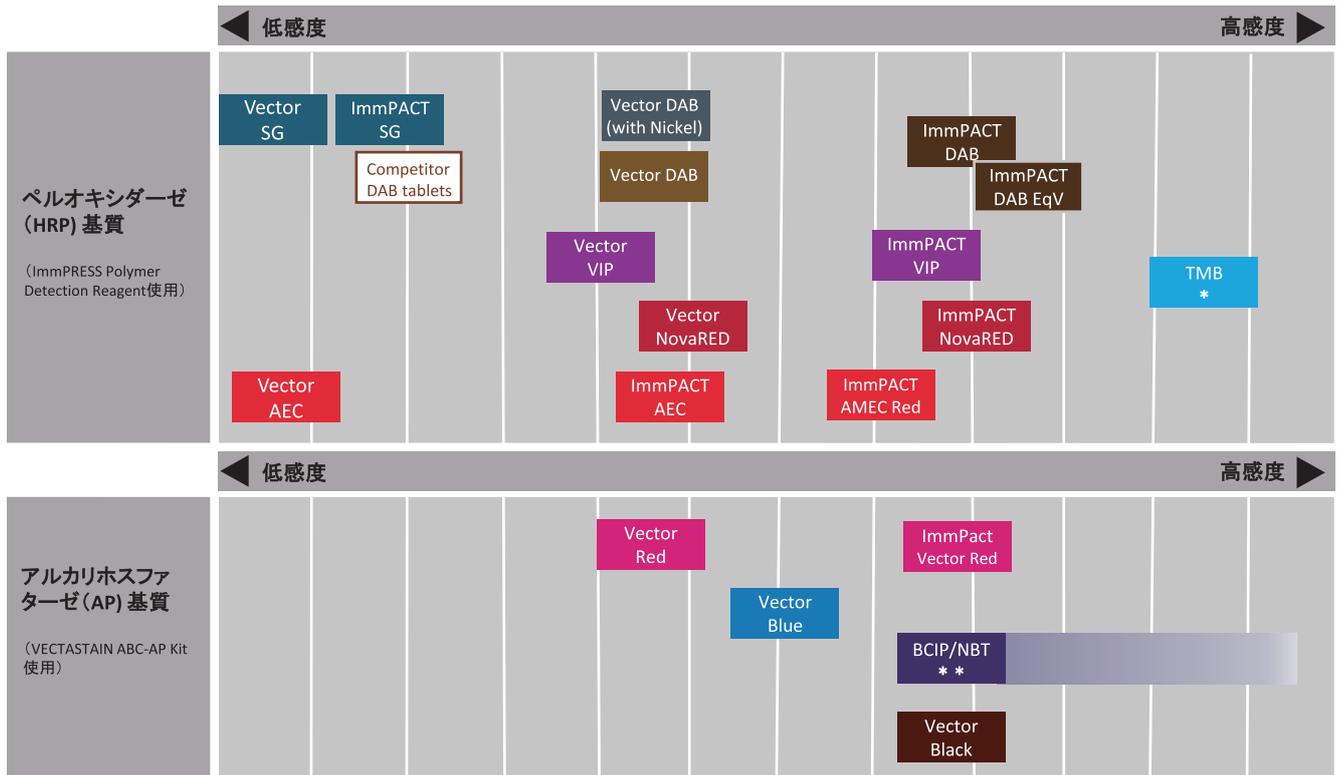
⇒ 固定によりマスクされた抗原を回復させるため、加熱やプロテアーゼ消化、Antigen Unmasking Solution (#H-3300, #H-3301, p.22 参照) などを用いて、抗原の賦活処理を行って下さい。

### ● 対比染色剤／封入剤

酵素反応生成物の中には、通常、封入剤に使用される非水溶性溶媒 (アルコール、キシレン、その他有機溶媒など) に溶解するものがあります。

⇒ 酵素反応生成物が、使用する対比染色や封入剤に適応しているかどうか確認し適切な試薬を用いるようにして下さい。

# 5. 免疫染色用基質キット



\* 反応産物の沈着が目立たず、色調にばらつきが見られることがあります。  
\*\* インキュベートの時間を長くすることで、感度が上昇します。

| 基質                 | 色           | 商品コード   | 顕微鏡    |        |       |       |           | 封入剤      | 色素を有した組織でのコントラスト | 多重染色 | 熱耐性<br>(※参照) |   |
|--------------------|-------------|---------|--------|--------|-------|-------|-----------|----------|------------------|------|--------------|---|
|                    |             |         | 明視野顕微鏡 | 暗視野顕微鏡 | 電子顕微鏡 | 蛍光顕微鏡 | スペクトル画像解析 |          |                  |      |              |   |
| ペルオキシダーゼ基質         |             |         |        |        |       |       |           |          |                  |      |              |   |
| DAB                | Brown       | SK-4100 | ●      | ●      | ●     |       | ●         | 非水溶性／水溶性 |                  | ●    | ●            |   |
| DAB-Ni             | Gray-Black  | SK-4100 | ●      | ●      | ●     |       | ●         | 非水溶性     |                  | ●    |              |   |
| ImmPACT DAB        | Brown       | SK-4105 | ●      | ●      | ●     |       | ●         | 非水溶性／水溶性 |                  | ●    | ●            |   |
| ImmPACT DAB EqV    | Brown       | SK-4103 | ●      | ●      | ●     |       | ●         | 非水溶性／水溶性 |                  | ●    | ●            |   |
| Vector VIP         | Purple      | SK-4600 | ●      | ●      | ●     |       | ●         | 非水溶性     | ●                | ●    | ●            |   |
| ImmPACT VIP        | Purple      | SK-4605 | ●      | ●      | ●     |       | ●         | 非水溶性     | ●                | ●    |              |   |
| Vector SG          | Blue-Gray   | SK-4700 | ●      | ●      | ●     |       | ●         | 非水溶性／水溶性 | ●                | ●    |              |   |
| ImmPACT SG         | Blue-Gray   | SK-4705 | ●      | ●      | ●     |       | ●         | 非水溶性／水溶性 | ●                | ●    |              |   |
| Vector NovaRED     | Red         | SK-4800 | ●      | ●      | ●     |       | ●         | 非水溶性     | ●                | ●    |              |   |
| ImmPACT NovaRED    | Red         | SK-4805 | ●      | ●      | ●     |       | ●         | 非水溶性     | ●                | ●    |              |   |
| Vector AEC         | Red         | SK-4200 | ●      |        |       |       | ●         | 水溶性      | ●                | ●    |              |   |
| ImmPACT AEC        | Red         | SK-4205 | ●      |        |       |       | ●         | 水溶性      | ●                | ●    |              |   |
| ImmPACT AMEC Red   | Red         | SK-4285 | ●      |        |       |       | ●         | 水溶性      | ●                | ●    |              |   |
| TMB                | Blue        | SK-4400 | ●      |        |       |       | ●         | 非水溶性     |                  |      |              |   |
| アルカリホスファターゼ基質      |             |         |        |        |       |       |           |          |                  |      |              |   |
| Vector Red         | Magenta     | SK-5100 | ●      |        |       |       | ●         | ●        | 非水溶性／水溶性         | ●    | ●            | ● |
| ImmPACT Vector Red | Magenta     | SK-5105 | ●      |        |       |       | ●         | ●        | 非水溶性／水溶性         | ●    | ●            | ● |
| Vector Blue        | Blue        | SK-5300 | ●      |        |       |       | ●         | ●        | 非水溶性／水溶性         | ●    | ●            | ● |
| Vector Black       | Brown-Black | SK-5200 | ●      |        |       |       |           |          | 非水溶性             |      |              |   |
| BCIP / NBT         | Indigo      | SK-5400 | ●      |        |       |       | ●         | ●        | 非水溶性／水溶性         |      | ●            | ● |

※加熱による抗原賦活化処理 (HIER) (例: Antigen Unmasking Solution を用いて圧力鍋で1分間処理した後、室温に戻し、バッファーで洗浄する。) に適用可能。

| Kit              | 呈色        | 用途  | 封入剤      | 商品コード   |
|------------------|-----------|---|----------|---------|
| ImmPACT DAB EqV  | Brown     | IHC, IC, プロットティング,<br>ISH, Elispot        | 非水溶性/水溶性 | SK-4103 |
| ImmPACT DAB      | Brown     |   | 非水溶性/水溶性 | SK-4105 |
| DAB              | Brown*    |   | 非水溶性     | SK-4100 |
| ImmPACT AMEC Red | Red       |   | 水溶性      | SK-4285 |
| ImmPACT AEC      | Red       |   | 水溶性      | SK-4205 |
| AEC              | Red       |   | 水溶性      | SK-4200 |
| TMB              | Blue      | IHC, IC, プロットティング,<br>ISH, ELISA, Elispot | 非水溶性     | SK-4400 |
| ImmPACT VIP      | Purple    | IHC, IC, プロットティング,<br>ISH, Elispot        | 非水溶性     | SK-4605 |
| VECTOR VIP       | Purple    |   | 非水溶性     | SK-4600 |
| ImmPACT SG       | Blue-Gray |   | 非水溶性/水溶性 | SK-4705 |
| VECTOR SG        | Blue-Gray |   | 非水溶性/水溶性 | SK-4700 |
| ImmPACT NovaRED  | Red       |   | 非水溶性     | SK-4805 |
| VECTOR NovaRED   | Brick-Red |   | 非水溶性     | SK-4800 |

IHC : Immunohistochemistry

ISH : *in situ* Hybridization

TMB : 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidine

ABTS : 2, 2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonic acid)

\*キットに含まれる塩化ニッケル溶液添加時には Gray-Black

IC : Immunocytochemistry

DAB : 3, 3'-Diaminobenzidine

AEC : 3-Amino-9-ethylcarbazole

4-CN : 4-Chloro-1-naphthol

免疫組織化学染色やニトロセルロース、ナイロンその他メンブレンを用いたプロットティング、EIA などに使用できる 13 種の基質キットがあります。各キットに含まれる試薬は、濃縮ストック溶液として便利な滴下瓶に入っています。

1 キットで 300 ml の基質溶液を調製でき、1,000~3,000 枚の組織切片を染色できます (#SK-4103 は 400 ml, #SK-4105 は 120 ml の基質溶液)。

**使用法**

**図解操作マニュアル p.48~49 参照**

**ペルオキシダーゼ基質キット  
使用上の注意**

- 試薬を滴下する際は、瓶の口を垂直に下に向け、静かに押し出して下さい。滴下瓶から直接ピペットで試薬を取り出すことは、絶対に避けて下さい。各試薬の溶媒により、1 滴の容量が異なります。直接滴下瓶を用いて基質溶液を調製することによって、正しい基質濃度が得られます。使用しない時は、蒸発を防ぐために、白色キャップをしっかりと締めて下さい。
- 各基質溶液は、使用直前に調製して下さい。
- 脱イオン水には、ペルオキシダーゼ反応の阻害物質が含まれていることがあるため、基質溶液は、蒸留水で調製して下さい。
- メンブレンの染色にはペルオキシダーゼを使用したことのない容器を用いて下さい。
- 試薬は 4℃ で遮光保存して下さい。
- DAB と塩化ニッケルには発がん性の疑いがあります。また各キットに含まれる、その他の成分の毒性および発がん性については、ほとんど分かっていません。これらの試薬を取り扱う際は、手袋、防護用衣服、防護メガネなどを着用し、十分注意を払って下さい。
- DAB, AEC, TMB 基質溶液は、蒸留水または脱イオン水で調製した 3% 過マンガン酸カリウムと 2% 炭酸ナトリウムを同量含む溶液中に廃棄して下さい。廃液は、所定の廃棄法に従って廃棄して下さい。
- 組織切片内在性のペルオキシダーゼが問題となる場合は、p.23 に記載の方法により、活性を抑えることができます。

| Kit                | 呈色            | 使用<br>バッファー pH | 用途                                     | 封入剤      | 商品コード   |
|--------------------|---------------|----------------|--|----------|---------|
| I (VECTOR Red)     | Red           | 8.2~8.5*       | IHC, IC, IF, ISH,<br>プロットティング, Elispot | 非水溶性/水溶性 | SK-5100 |
| II (VECTOR Black)  | Brown-Black   | 9.5            | IHC, IC, プロットティング,<br>Elispot          | 非水溶性     | SK-5200 |
| III (VECTOR Blue)  | Blue          | 8.2            | IHC, IC, IF, ISH,<br>プロットティング, Elispot | 非水溶性/水溶性 | SK-5300 |
| IV (BCIP / NBT)    | Blue / Violet | 9.5            |  | 非水溶性/水溶性 | SK-5400 |
| ImmPACT Vector Red | Red           | —              |  | 非水溶性/水溶性 | SK-5105 |

BCIP : 5-Bromo-4-chloro-indolyl phosphate    NBT : Nitroblue tetrazolium    IF : Immurofluore science

\*使用バッファーの濃度は 100~200 mM に調整して下さい。

※ImmPACT Vector Red (#SK-5105) は、VECTOR Red よりも高感度な赤色基質です。

各基質キットには、滴下瓶に入った 3 種のストック溶液と基質溶液を調製するのに便利な、混合用の瓶が入っています。

染色が終了したら希釈基質溶液を捨て、容器を蒸留水で洗浄し、ストック溶液と一緒にキットの箱に保管します。

1 キットで約 200 ml の基質溶液を調製できます。

#### 使用法 (Kit I ~IV)

1. 基質溶液の調製：使用直前に、100 mM Tris-HCl pH 8.2~10.0 (注：pH は基質により異なります) 5 ml に、試薬 1 を 2 滴加えてよく混ぜます。次に試薬 2 を 2 滴加えてよく混ぜ、最後に試薬 3 を 2 滴加えてよく混ぜます。
2. 組織切片またはメンブレンと基質溶液を 20~30 分間、室温で反応させます (反応時間を長くすると感度が増大しますが、バックグラウンドも高くなる傾向があります)。染色を暗所で行うと、良い結果が得られることがあります。
3. バッファーで 5 分間洗浄し蒸留水ですすぎます。
4. 組織切片染色の場合、必要に応じて対比染色後、封入します (封入剤は各基質に適したものを使用して下さい)。

#### アルカリホスファターゼ基質キット 使用上の注意

- 試薬を滴下する際は、瓶の口を垂直に下に向け、静かに押し出して下さい。滴下瓶から直接ピペットで試薬を取り出すことは絶対に避けて下さい。各試薬の性質により 1 滴の量が異なります。滴下瓶から直接滴下することによって正しい基質濃度が得られます。使用しない時は、蒸発を防ぐために、白色キャップをしっかりと締めて下さい。
- 基質溶液の調製に使用するバッファーにアジ化ナトリウムを加えないで下さい。染色が阻害されます。
- 試薬は 4℃ で遮光保存して下さい。
- 長期保存により、試薬に沈殿が生じることがありますが、染色の質、強度に影響はありません。
- 各キットのストック試薬および希釈基質溶液を加熱しないで下さい。染色感度が低下します。

- キット I, III, IV で染色した切片は、水溶性、非水溶性いずれの溶媒でも脱水、封入できます。キット III による染色は、キシレンに部分的に溶解するため、キシレンの代わりに Histo-Clear\*<sup>1</sup>, Clear-Rite 3\*<sup>1</sup>, またはその他のキシレン代替剤\*<sup>2</sup> を用いて透徹し、キシレンを含まない封入剤で封入して下さい。キット III で染色後、水溶性封入剤を用いる場合は、封入前に 100% アルコールで短時間 (約 30 秒間) 洗浄すると、明瞭な染色が得られます。

- 各キットとも神経組織の染色には適していません。
- 組織化学染色の場合、基質溶液に Tween 20 を 0.1% になるように加えると発色が鮮明になり、染色感度も上がります。メンブレンを染色する場合には、Tween 20 は使用しないで下さい。
- 組織切片に内在性のアルカリホスファターゼ活性が存在する場合は、p.23 に記載の方法により、活性を抑えることができます。

\*<sup>1</sup> Histo-Clear は National Diagnostics, Clear-Rite 3 は Thermo Fisher Scientific の製品です。

\*<sup>2</sup> Clear Advantage (Polyscience 社 : #24770), ティッシュ・テックティッシュクリア (サクラファインテックジャパン (株) : #1474) などがあります (p.165 参照)。

#### MEMO

VECTOR Red, ImmPACT Vector Red 反応生成物は強い赤色蛍光を示すので、ローダミンまたは Texas Red の励起フィルターシステムで鮮赤色の蛍光沈殿物を観察できます。特に、脱水後永久封入した切片は、ローダミンフィルターシステムで鮮やかに見えます。

#### MEMO

発色がうまく起らない場合は、使用バッファーの pH や濃度が原因になっていることがあります。バッファーの条件をよくご確認下さい。

## 6. 蛍光標識アビジンを用いた二重染色法

### アビジン D の性質

VECTOR 社がアビジン・ビオチンシステムの開発を始めた時、まず市販されているすべての卵白アビジンの分析を試みました。その結果、調べた製品はすべて、分子量 12 kDa の非特異的結合性が高い夾雑物を含んでいることが明らかになりました。

これら市販のアビジンは OD<sub>280 nm / 260 nm</sub> 比が約 0.8 で、核酸が含まれていることを示唆していました。VECTOR 社では卵白アビジンを精製するためのアフィニティシステムを開発し、SDS-PAGE で均一なアビジンを精製しました。このアビジンの OD<sub>280 nm / 260 nm</sub> 比は 1.6~1.9 で、非常に低い非特異的結合性を示します。このアビジン製品は、他の市販品とは明らかに異なっていたため、“アビジン D” (Avidin Distinct) と名付けられました。

更に、種々の方法を用いてアビジンの精製が試みられ、その結果異なったタイプのアビジンがあることが分かりました。それぞれのタイプは用途に対する性能が異なります。そこで VECTOR 社は、アビジン D の各タイプに、使用目的に関連する頭文字を付けました。例えばアビジン DN はビオチン標識核酸用に、アビジン DH\* は“ABC”法に用います。良い実験結果を得るには、アビジン・ビオチンシステムの使用目的に合わせて、アビジンの型を選ぶ必要があります。

\*Avidin DH は VECTASTAIN ABC キット用に特別に調製された製品です。Avidin D とは異なり、単品では販売していません。

### 蛍光標識アビジン

アビジン D、またはアビジン DCS (高感度) を各種蛍光色素で標識した製品です。

蛍光標識アビジン DCS は、セルソーター用として開発された製品ですが、高感度と低バックグラウンドが必要な場合の蛍光顕微鏡での観察用としても用いられます。

※詳細は p.188 をご覧下さい。

Fluorescein Avidin D (#A-2001)

Fluorescein Avidin DCS (#A-2011)

Rhodamine Avidin DCS (#A-2012)

Texas Red Avidin D (#A-2006)

Texas Red Avidin DCS (#A-2016)

蛍光標識アビジン D の波長特性

|                          | 励起波長   | 蛍光波長   | 色   |
|--------------------------|--------|--------|-----|
| Fluorescein              | 495 nm | 515 nm | 黄緑色 |
| Rhodamine                | 550 nm | 575 nm | 赤色  |
| Rhodamine <sub>600</sub> | 575 nm | 600 nm | 赤色  |
| Texas Red                | 595 nm | 615 nm | 濃赤色 |

## 蛍光標識アビジンを用いた蛍光二重染色プロトコル

1. 組織切片を適切な方法で固定します。
2. 切片を風乾します。
3. バッファー（PBS または TBS を推奨）で 2 分間ずつ 2 回洗浄します。

### ●第 1 の抗原検出

4. 内因性ビオチンをブロッキングする必要がある場合は、Avidin / Biotin Blocking Kit (#SP-2001, p.130 参照) を使用して下さい。まず切片を Avidin 溶液で 15 分間インキュベートします。バッファーで軽く洗浄した後、Biotin 溶液で 15 分間インキュベートします。最後にバッファーで 2 分間ずつ 2 回洗浄します。内因性ビオチンが問題とならない場合は、このステップは省略して下さい。
5. 5% ブロッキング用正常血清を滴下し、20 分間反応させます。
6. 切片から余分なブロッキング用正常血清を吸い取ります。
7. 5% 正常血清を含む PBS で希釈した第 1 の一次抗体を滴下し、反応させます。
8. バッファーで 5 分間洗浄します。
9. 5% 正常血清を含む PBS で希釈した第 1 のビオチン標識二次抗体を滴下し、30 分間反応させます。
10. バッファーで 5 分間洗浄します。
11. 蛍光標識アビジン DCS を滴下し、5~10 分間反応させます。
12. バッファーで 5 分間洗浄します。

### ●第 2 の抗原検出

13. 内因性ビオチンのブロッキングを行います。ステップ 4 に従って下さい。
14. 5% ブロッキング用正常血清を滴下し、20 分間反応させます。
15. 切片から余分なブロッキング用正常血清を吸い取ります。
16. 5% 正常血清を含む PBS で希釈した第 2 の一次抗体を滴下し、反応させます。
17. バッファーで 5 分間洗浄します。
18. 5% 正常血清を含む PBS で希釈した第 2 のビオチン標識二次抗体を滴下し、30 分間反応させます。
19. バッファーで 5 分間洗浄します。
20. ステップ 11 とは異なる蛍光標識アビジン DCS を滴下し、5~10 分間反応させます。
21. バッファーで 5 分間洗浄します。
22. VECTASHIELD Mounting Medium (#H-1000, p.170 参照) などの封入剤で封入します。

### ●MEMO ●

#### Biotinylated Anti-Avidin (#BA-0300) を用いた蛍光の増幅方法

1. 細胞または組織中の目的抗原を、ビオチン標識抗体\*で標識します。
2. Fluorescein Avidin DCS (#A-2011) を反応させます。
3. 次に Biotinylated Anti-Avidin (#BA-0300) を反応させます。
4. もう一度 Fluorescein Avidin DCS (#A-2011) を反応させます。
5. 増幅された蛍光を観察します。

\*非標識一次抗体+ビオチン標識二次抗体またはビオチン標識一次抗体をご使用下さい。

※この方法は Biotinylated Anti-Avidin (#BA-0300) のデータシートに記載されています。

※Immunofluorescence, FISH, Flow Cytometry に応用可能です。

※蛍光標識 DCS を用いて Avidin-Biotin Complex を形成させることはできません。

