

免疫染色 図解マニュアル

1 準備するもの

2 前処理

3 疎水性バリア形成

4 ブロッキング

5 抗原抗体反応

6 基質反応

7 脱水・透徹・封入

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ください。
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。

1 準備するもの①

- 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

1 準備するもの②

- 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



2 前処理①

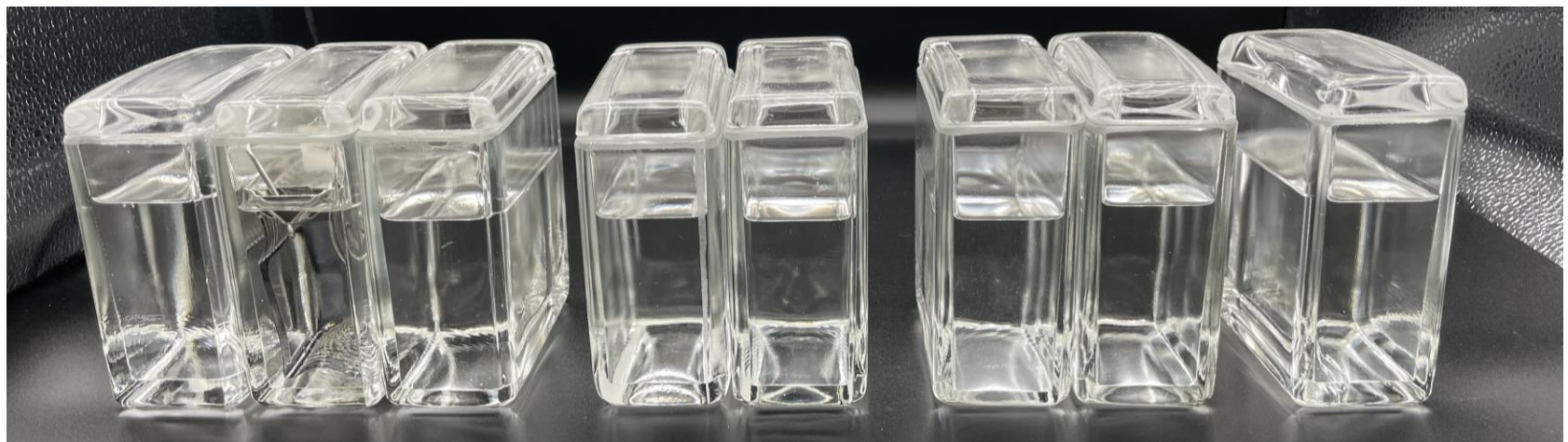


かごを移し替える際は溶液を持ち込まないように液を良く切ること

- 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。



キシレン
または
キシレン代替品

100%
EtOH

95%
EtOH

70%
EtOH

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！

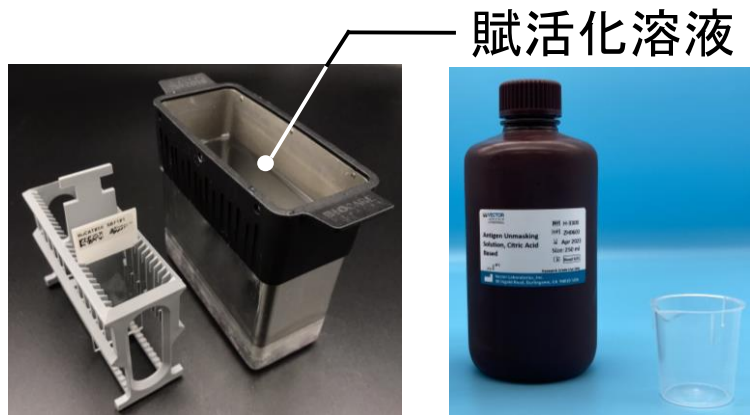


5分以上浸した後、
染色かごを傾けて水切り



2 前処理③

- 抗原賦活化
90°C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



TIPS

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



3 疎水性バリア形成

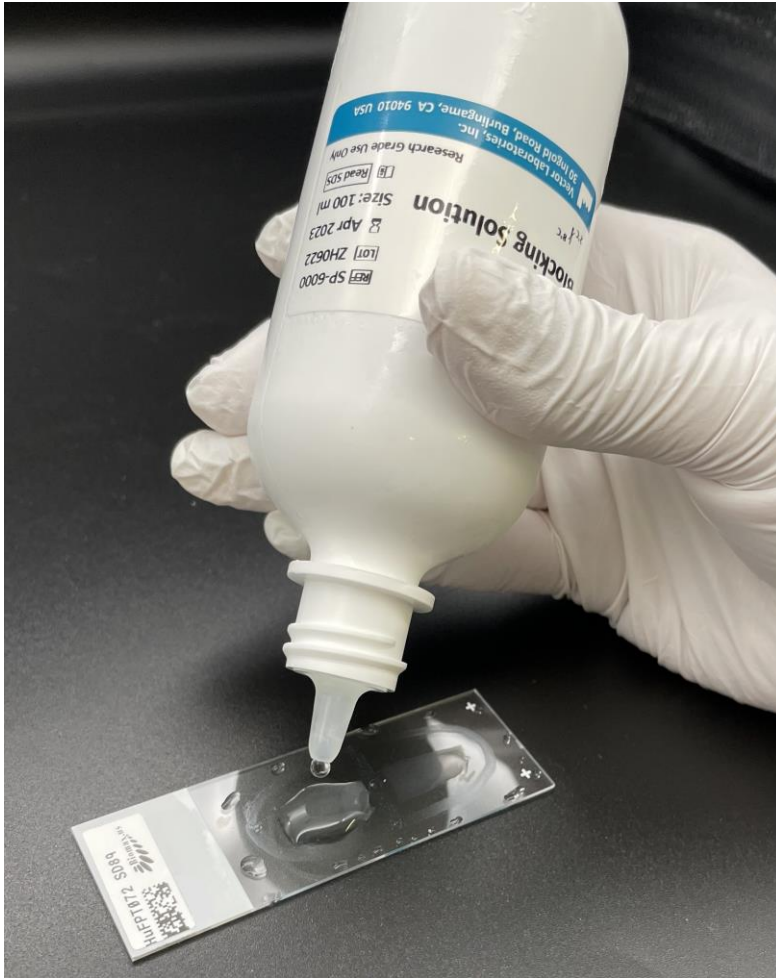


ImmEdge Penをよく振ってから
切片の周囲に線を引き、疎水
性バリアを形成する。



液が出てこないときは、
ペン先にしみるまで
押し下げしてみる

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。



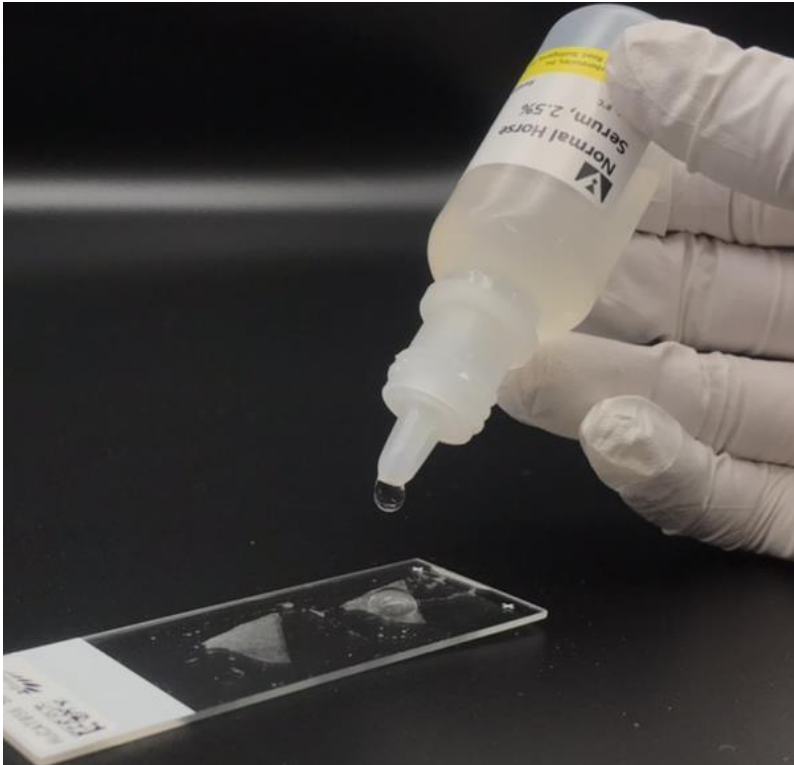
2～3回必ず
じゃぶじゃぶ！



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

5 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

抗体希釈液 (PBS, 血清, BSAなど) を用いて一次抗体を希釈
↓

一次抗体を切片に滴下してインキュベート
37°C, 60分間 または 4°C, 一晩



5 抗原抗体反応②

- 洗浄

PBSで5分以上洗浄する。



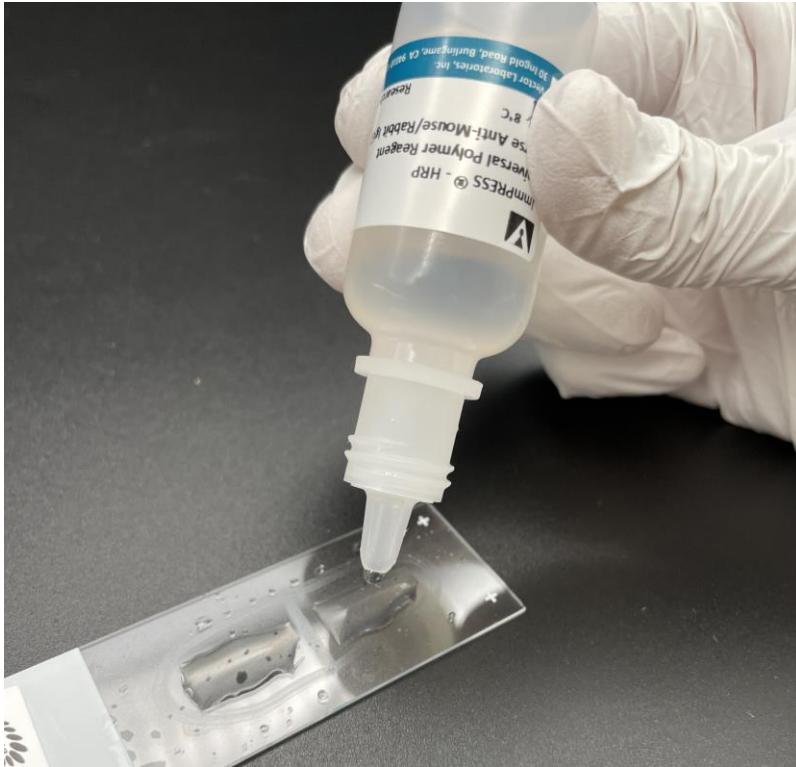
2～3回必ず
じゃぶじゃぶ！



5分以上浸した後、
染色かごを傾けて水切り



5 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

6 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 Diluent (1 ml)



← ImmPACT DAB Reagent 1 (1滴)

6 基質反応②

- 反応

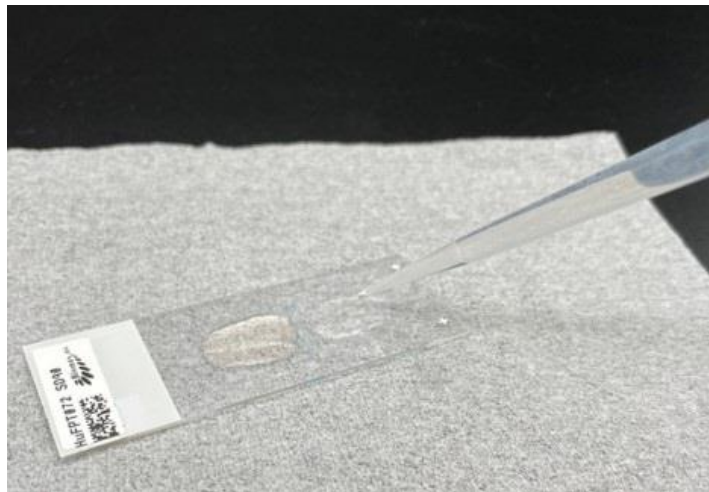
準備した酵素基質溶液を滴下し、数分間インキュベート

↓

蒸留水で洗浄する



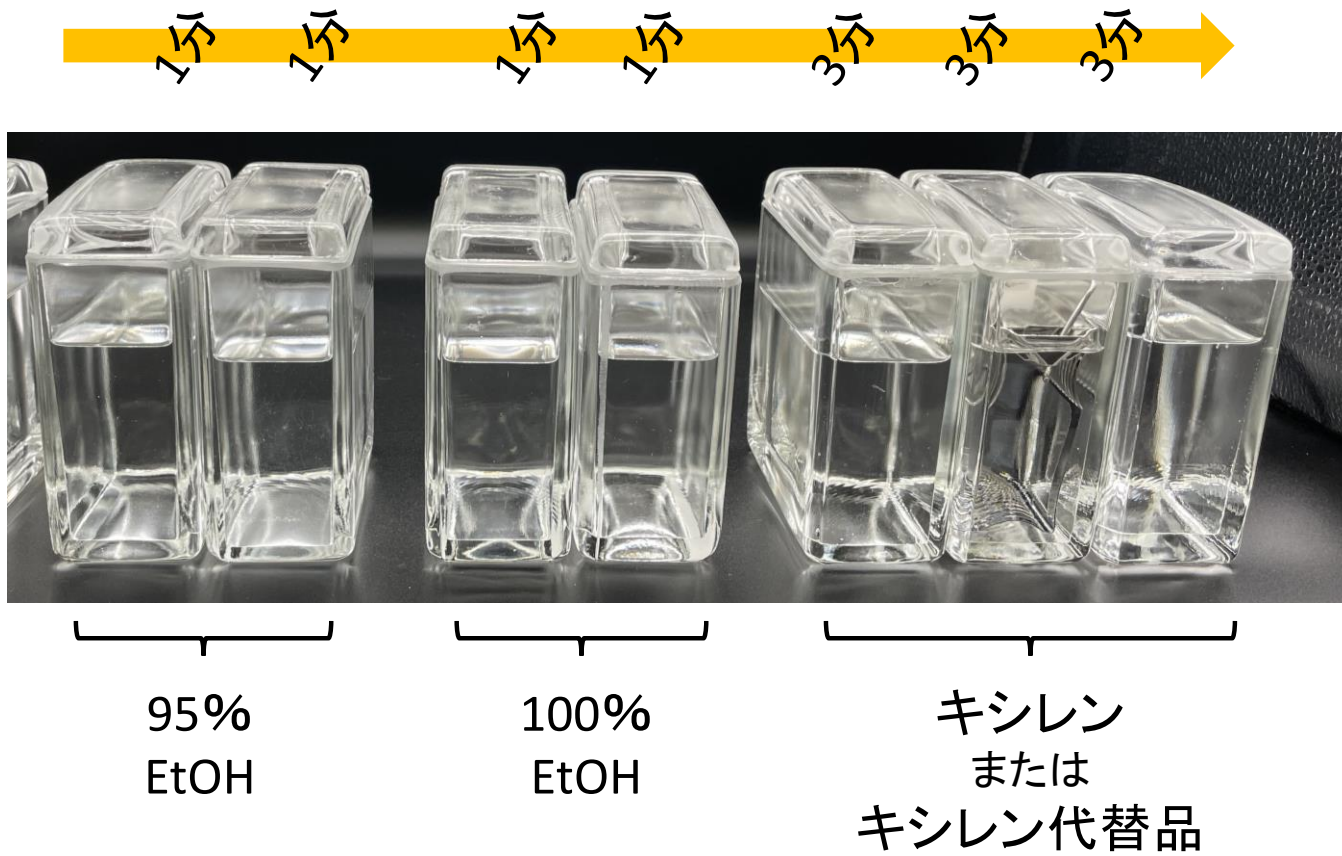
発色時間は染まり具合を見ながら調整



※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



7 脱水・透徹・封入②



- 封入

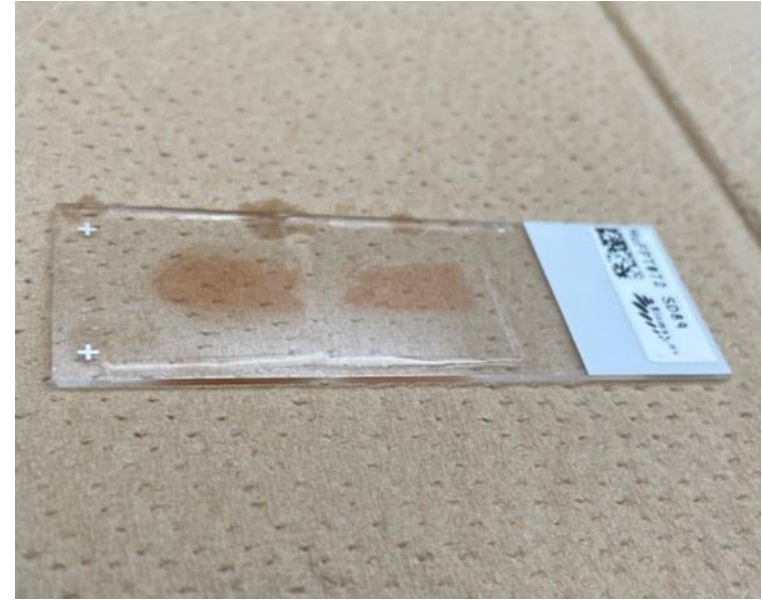
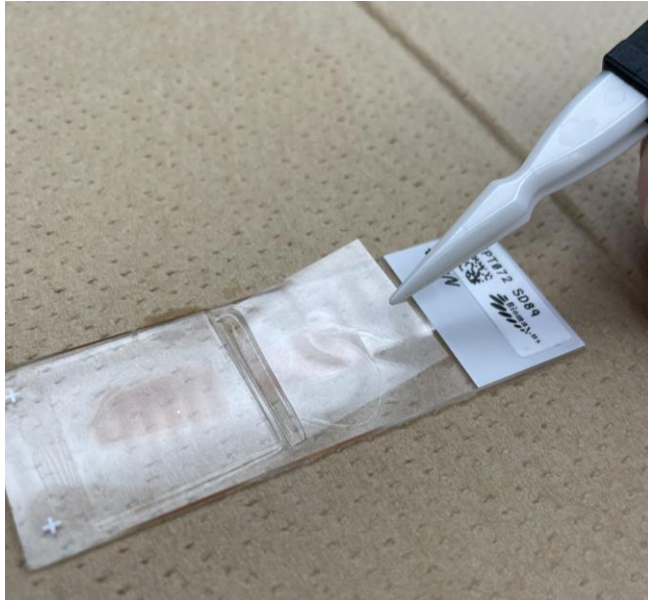
封入剤を滴下する。



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

7 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

※[リンク](#)をクリックすると製品詳細をご覧ください

- 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

VECTOR
LABORATORIES
part of Maravai LifeSciences

[Antigen Unmasking Solution](#)

商品コード：H-3300



VECTOR
LABORATORIES
part of Maravai LifeSciences

[ImmEdge Pen](#)

商品コード：H-4000



参考：本マニュアルで使用している製品

※[リンク](#)をクリックすると製品詳細をご覧ください

- 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**

VECTOR
LABORATORIES
part of Marvai LifeSciences

BLOXALL

商品コード：SP-6000



VECTOR
LABORATORIES
part of Marvai LifeSciences

ImmPRESS
Reagent



VECTOR
LABORATORIES
part of Marvai LifeSciences

酵素基質

商品コード：SK-4105



参考：本マニュアルで使用している製品

※[リンク](#)をクリックすると製品詳細をご覧ください

VECTOR
LABORATORIES
part of Marvai LifeSciences

VectaMount Permanent
Mounting Medium

商品コード：H-5000



□ 封入剤

□ キシレン または

キシレン代替品

□ 抗原賦活化装置


GenoStaff

G-NOX

商品コード：H-5000



BIOCARE
MEDICAL

Decloaking Chamber

NxGen

商品コード：DC2012-UPT

