

免疫組織化学染色プロトコール パラフィン包埋切片

ホルマリン固定したパラフィン包埋切片の染色手順を一般的な指針として示します。検出系は未標識の精製抗体、ビオチン標識2次抗体、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン(Sav-HRP)とDABを用いたものです。抗原によって固定方法、増感方法の最適な条件が異なるため、全ての抗原に良好な結果が得られる方法は存在しません。そのため、対象の抗原ごとに最適な条件を決める必要があります。個々の抗原に対する染色プロトコールや便利なヒント、免疫組織化学のトラブルシューティングガイドはIHC World web site (<http://www.ihcworld.com/>) を参照してください。

ホルマリン固定、パラフィン包埋組織の準備

1. 新鮮な3 mm角程度に切り出した組織ブロックを10%ホルマリンもしくはその他の固定剤で室温24~48時間固定します。(注意:ホルマリンは発がん性の危険があり、目、皮膚、気道に刺激性があるため、各器官・部位をフードなどで覆った状態で行ってください。)
2. 水道水で1時間組織を洗います。
3. 70%, 80%, 95%のエタノールでそれぞれ45分間組織を浸し、100%エタノールは1時間ずつ3回換えて脱水する。
4. キシレンに浸し、1時間ずつ2回換え、きれいにします。
5. パラフィンに浸し、1時間ずつ3回換えます。
6. 組織をパラフィンブロックにします。この状態で数年の保管ができます。
7. パラフィン包埋ブロックをマイクロームで5~8 μ mに薄切し、40°Cの蒸留水中に浮かべます。
8. 免疫組織染色に適したガラススライドに切片を移し、オーバーナイトで乾燥させ使用するまで室温で保管します。

内因性ペルオキシダーゼ活性阻害

9. 脱パラフィンするスライドをキシレンに浸し5分毎に別のキシレンに2回移します。
10. スライドを100%エタノールに移し、3分毎に別のエタノールに2回移し、その後、95%、70%、50%のエタノールにそれぞれ3分間ずつ移していきます。
11. 3% H₂O₂/メタノール溶液に移し室温で10分間内在性ペルオキシダーゼをブロックします。
12. 300mlのPBSを用いて、スライドを5分間ごとに2回PBSを換え洗浄します。

抗原の賦活化

13. (オプション) マスクされた抗原のエピトープを抗原の賦活化を行います。最も一般的な方法はクエン酸バッファー法です。染色容器を用意しスライドをセットします。pH6.0 10mMのクエン酸バッファー300mLを注ぎ、95~100°Cで10分間(最適な条件は事前に決定してください。)インキュベーションします。染色容器を取り出し室温に戻すため20分間置きます。
14. 300mlのPBSを用いて、スライドを5分間ごとに2回PBSを換え洗浄します。
15. (オプション) 10% fetal bovine serum in PBSのようなブロッキングバッファー100 μ lをスライドに注ぎ、湿潤チャンバーで室温1時間置きます。
16. スライドガラスからブロッキングバッファーを除きます。

一次抗体反応

17. 100 μ lの最適に希釈した一次抗体をスライドに注ぎ、湿潤チャンバーで室温1時間反応します。抗体の希釈には0.5% bovine serum albumin in PBS等を使用します。
18. 300ml 10mM pH7のPBSを用いて、スライドを5分間ごとに2回PBSを換え洗浄します。

ビオチン抗体反応

- 100 μ lの最適に希釈したビオチン標識抗体をスライドに注ぎ、湿潤チャンバーで室温30分間反応します。
- 300mlのPBSを用いて、スライドを5分間ごとに2回PBSを換え洗浄します。

Sav-HRP

- 100 μ lの最適に希釈したSav-HRPをスライドに注ぎ、湿潤チャンバーで室温遮光30分間反応します。
- 300mlのPBSを用いて、スライドを5分間ごとに2回PBSを換え洗浄します。

DAB基質

- 用事調製したDAB基質溶液(0.05% DAB - 0.015% H₂O₂ / PBS) 100 μ Lをスライド切片に加え抗体染色を発色させます。通常5分未満で望ましい発色が得られます。(注意: DABは発がん性が疑われています。取扱いには注意してグローブ、白衣、ゴーグル等を着用してください。)
- 300mlのPBSを用いて、スライドを5分間ごとに2回PBSを換え洗浄します。

(オプション)対比染色

- (オプション)ヘマトキシレン等を用いて対比染色します。
- 流水で15分間以上洗います。

マウント

- 5分間ごとに95%, 95%, 100% and 100%のエタノールに浸し脱水します。
- キシレンでスライドを3回洗った後、カバースライドをPermount等のマウンティング溶液を用いて閉じます。マウントしたスライドは室温で保存できます。

鏡見

- 光学顕微鏡で抗体染色による発色を観察します。

トミーデジタルバイオロジー株式会社

カスタマーサポート

〒110-0008東京都台東区池之端2-9-1

TEL : 03-5834-0843 Fax : 03-5815-0813

mail : Biolegend@digital-biology.co.jp