

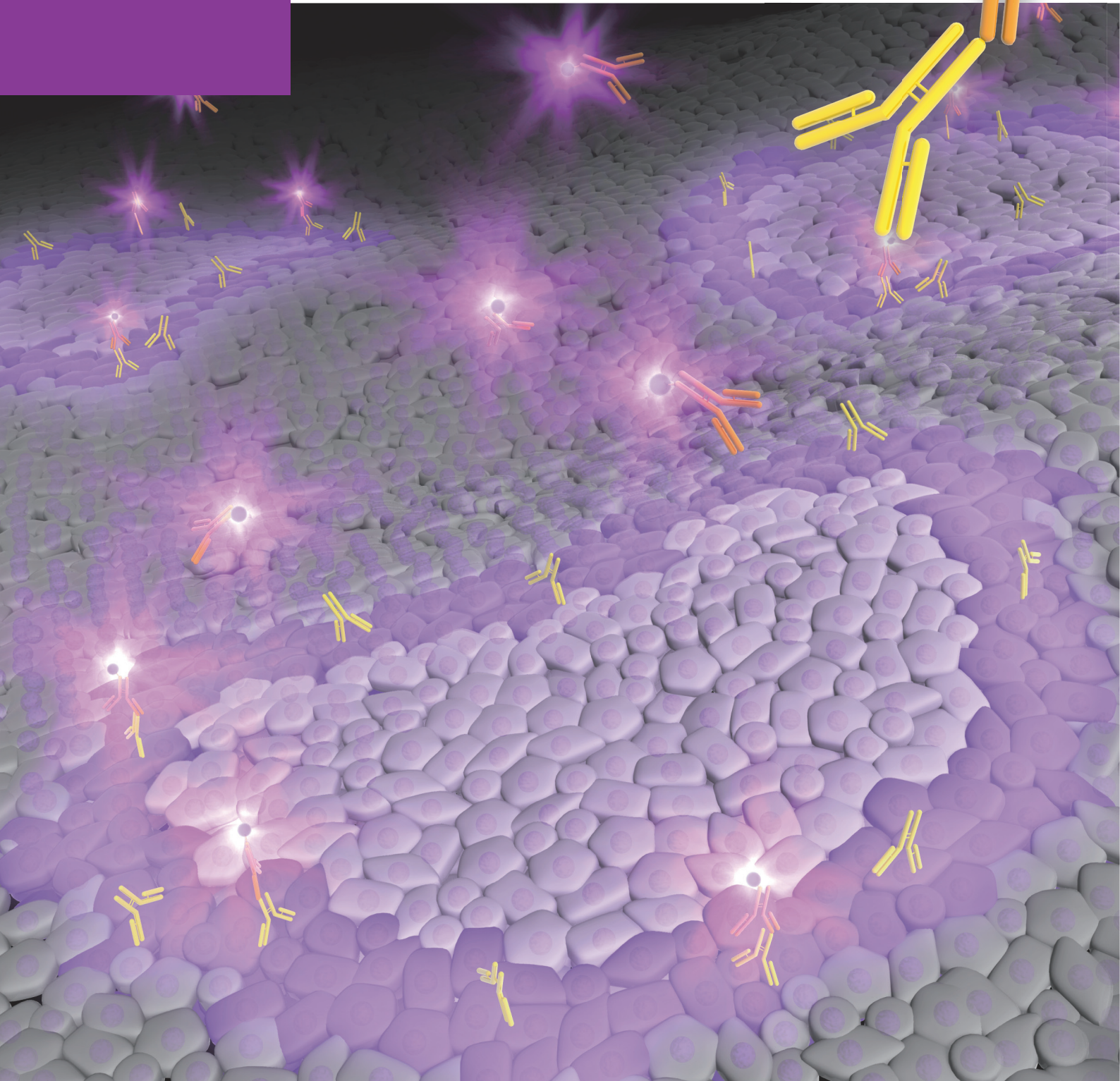
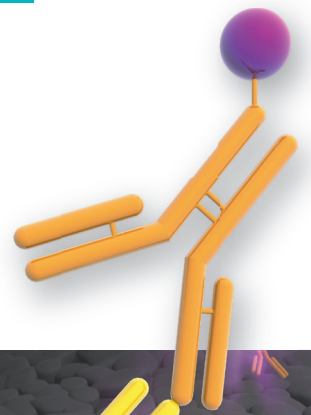
免

Immunohistochemistry

よく解る
実験プロトコール

疫組織染色

ver. 1.4



目次

組織切片作製(固定)	4
切片.....	4
固定液.....	4
固定法.....	5
実験プロトコール(灌流法).....	5
実施例.....	5
参考文献.....	5
組織切片作製(脱水・置換)	6
脱水.....	6
置換.....	6
実験プロトコール.....	6
実施例.....	6
組織切片作製(包埋)	7
包埋.....	7
実験プロトコール.....	7
組織切片作製(切片の作製)	8
切片の作製.....	8
脱パラフィン処理.....	9
実験プロトコール.....	9
抗原の賦活化	10
抗原賦活化処理.....	10
実験プロトコール.....	10
実施例.....	11
参考文献.....	11
ブロッキング	12
ブロッキング.....	12
1. 抗体の非特異的吸着の抑制.....	12
実験プロトコール.....	12
実施例.....	13
2. 内在性ビオチンのブロッキング.....	14
実験プロトコール.....	14
3. 内在性ペルオキシダーゼのブロッキング.....	15
実験プロトコール.....	15
参考文献.....	15

目次

発色検出..... 16

発色検出.....	16
高感度検出.....	16
1. ペルオキシダーゼ検出系 (LSAB 法).....	17
実験プロトコール.....	17
実施例.....	17
2. アルカリホスファターゼ検出系.....	18
実験プロトコール.....	18
実施例.....	18
参考文献.....	18

蛍光検出..... 19

1. 蛍光検出.....	19
実験プロトコール.....	19
実施例.....	20
2. 自家蛍光の抑制.....	20
実験プロトコール.....	20
実施例.....	20
参考文献.....	20

ヘマトキシリン - エオジン染色..... 21

ヘマトキシリン - エオジン染色.....	21
実験プロトコール.....	21
実施例.....	21

封入..... 22

封入.....	22
1. 非水溶性封入剤での封入 (例：DAB 染色後).....	22
実験プロトコール.....	22
2. 水溶性封入剤での封入 (例：蛍光染色後).....	23
実験プロトコール.....	23
実施例.....	23

試薬一覧..... 別紙

組織切片作製(固定)

切片

切片にはパラフィン切片と凍結切片があり、抗原性の維持や再現性、操作性などに違いがあります。

■ 主な切片の種類

切片の種類	長所	短所
パラフィン切片	<ul style="list-style-type: none"> 再現性に優れる。 3~10μm 程度の切片の作製が可能である。 	<ul style="list-style-type: none"> 有機溶媒の使用や加熱などの操作が多く、抗原性の保持や細胞膜上の抗原を検出する際に影響がある。
凍結切片	<ul style="list-style-type: none"> 有機溶媒の使用や加熱などの操作が無いので、抗原の反応性や膜の構造も維持されやすい(膜タンパク質や脂肪細胞の検出に適す)。 切片の作製までにかかる操作が少なく短時間で切片作製が可能である。 10~20μm 程度の切片の作製に適している。 	<ul style="list-style-type: none"> 結晶の形成によりサンプルがダメージを受ける場合がある。 パラフィン包埋を行った試料よりも、再現性が低い。

固定液

組織の固定を行う目的の一つは、試料中に含まれているタンパク質分解酵素、核酸分解酵素などの活性を失活させ、試料の変性を防ぐことです。また、その他の重要な目的は標本中のタンパク質の位置を高分子間の架橋により固定し、流動を無くすことです。さまざまな固定液がありますが、それぞれの長所や短所を把握し、選択する必要があります。

■ 固定液の種類

固定液	例	固定化時間	長所 / 短所
ホルマリン	<ul style="list-style-type: none"> 10% 中性緩衝ホルマリン 4% パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液 	<ul style="list-style-type: none"> 8 時間以上(完全な固定化には 21~36 時間必要) 	<p>長所</p> <ul style="list-style-type: none"> 最も一般的な固定化法 <p>短所</p> <ul style="list-style-type: none"> 固定化の浸透が遅い 抗原賦活が必要 劇物を含み取り扱いや廃棄に特別な処置が必要
亜鉛ホルマリン	<ul style="list-style-type: none"> 硫酸亜鉛とホルマリンの混合物 	<ul style="list-style-type: none"> 4~48 時間 	<p>長所</p> <ul style="list-style-type: none"> ホルマリンよりも短時間で固定可能 組織の形態を良く維持する 抗原の賦活を必要としないケースが多い <p>短所</p> <ul style="list-style-type: none"> 初期蛍光を消光する可能性 劇物を含み取り扱いや廃棄に特別な処置が必要
アルコール / アセトン	<ul style="list-style-type: none"> 70%、90% エタノールまたは 90% エタノール / アセトン 	<ul style="list-style-type: none"> 10~15 分(クライオスタット切片 / 細胞標本) 	<p>長所</p> <ul style="list-style-type: none"> 細胞質の中間径フィラメントの保持に優れる <p>短所</p> <ul style="list-style-type: none"> 組織の収縮・硬化
ブアン	<ul style="list-style-type: none"> ホルマリンとピクリン酸の混合物 	<ul style="list-style-type: none"> 1~12 時間 	<p>長所</p> <ul style="list-style-type: none"> 迅速な固定化法 内分泌組織や腫瘍に有効 <p>短所</p> <ul style="list-style-type: none"> 抗原(特に脂質を含む抗原)が保持され難い 固定化後、ピクリン酸の除去が必要 劇物を含み取り扱いや廃棄に特別な処置が必要

4%-Paraformaldehyde Phosphate Buffer Solution (#09154-14)



Nacalai オンラインカタログへ

10%-Formaldehyde Neutral Buffer Solution (#37152-51)



Nacalai オンラインカタログへ

Zinc Formalin Fixative, pH 6.25 (#37679-84)



Nacalai オンラインカタログへ

組織切片作製(固定)

固定法

1) 浸漬法

一般的に用いられている固定法で、動物の組織切片を固定液に投入させて浸漬・固定させる方法です。

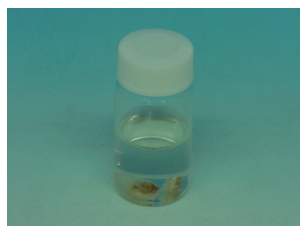
2) 灌流法

仮死状態の動物の血管中の血液を固定液で置換する方法で、全身の組織に固定液が急速かつ均一に浸透する利点があります。

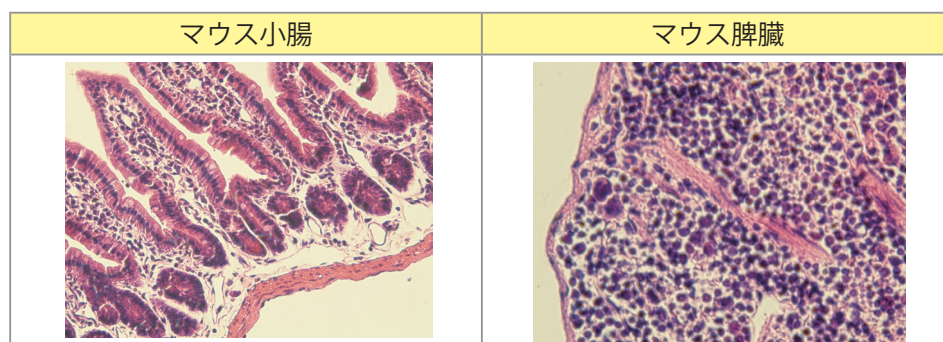
実験プロトコール(灌流法)

以下に弊社 4% パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液(4% PFA)を用いた灌流法を紹介します。

- ① マウスに麻酔液を腹腔内投与し、痛覚刺激に反応が無いことを確かめた後に、台の上に固定します。
- ② 開腹後に横隔膜を切開し、肋骨を切断し、心臓を露出させます。
- ③ チューブにつけた注射針を左心室に刺します。右心耳を切開します。
- ④ ペリスタルティックポンプを流速 0.5ml/ 秒の流量に設定し、PBS を灌流し、脱血します。
- ⑤ PBS を 4% PFA に換え、200ml 程度の固定液をペリスタルティックポンプ(0.5ml/ 秒程度)で流します。
- ⑥ 各組織は摘出後、1~2 日、4% PFA に浸しておきます。



実施例



マウスを弊社 4% PFA を用い灌流固定し、採取した組織を 4% PFA に浸漬して一晩固定した。その後パラフィン包埋し切片を 5 μ m で作製、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。

参考文献

- Ramos-Vara JA. *et al.* When tissue antigens and antibodies get along: revisiting the technical aspects of immunohistochemistry--the red, brown, and blue technique. *Vet Pathol.* 51(1), 42-87 (2014).

4%-Paraformaldehyde Phosphate
Buffer Solution
(#09154-14)



Nacalai オンラインカタログへ

組織切片作製(脱水・置換)

脱水

組織の70~80%は水分が占めており、そのままではパラフィンが組織内に浸透しません。そこで、まず組織内の水をアルコール系列で完全に除去します。

脱水溶剤	長所	短所
エタノール	毒性が低い、安全	脱水に時間を要する
ヒストール(組織学用)	課税対象でないため安価	メタノール含有

※ヒストールは、エタノール、メタノールおよび2-プロパノールの混合液(エタノール約88%、メタノール3%、2-プロパノール9%)

置換

脱水工程で使用したアルコールはパラフィンに馴染みません。そこで、パラフィンとアルコールに溶けやすい中間剤を使って細胞内に染みこんでいるアルコールを除去し、パラフィンが馴染むようにします。中間剤は一般的にはキシレンやクロロホルムなどの有機溶剤が広く用いられていますが、毒性が指摘されているため、害の少ない代替品(例：D-リモネン)も利用されています。

置換溶剤	置換時間	長所	短所
キシレン	約1時間	安価	劇物
D-リモネン	約1時間	非劇物	高価

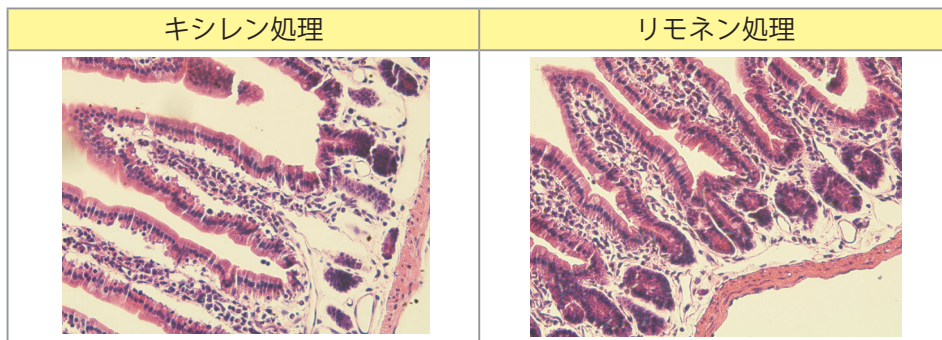
実験プロトコール

以下に弊社試薬を用いたプロトコールを紹介します。

- ① 固定後、70% エタノールの入った染色瓶(ドーゼ)に2~3時間浸漬します。
*エタノールはヒストールに代替可能です。
- ② 新しい70% エタノールでオーバーナイトインキュベーションします。
- ③ 80% エタノールに1時間浸漬します。
- ④ 90% エタノールに1時間浸漬します。
- ⑤ 99.5% エタノールに1時間浸漬します。
- ⑥ 無水エタノールに1時間浸漬します。この操作を合計で2回行います。
*無水エタノールはエタノールにモレキュラーシーブを加え一晩置いたものです。
- ⑦ キシレンに1時間浸漬します。この操作を合計で3回行います。
*キシレンはD-リモネンに代替可能です。

実施例

以下にキシレンとリモネンにより処理したマウス小腸をヘマトキシリン・エオジン染色した例を示します。キシレン処理、リモネン処理において、共に適切な染色像が得られています。

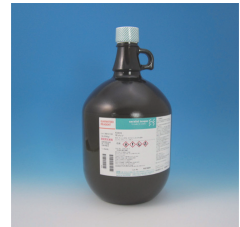


Histol
(#18167-74)



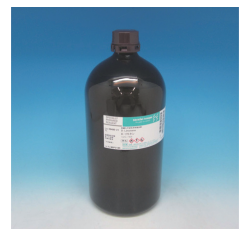
Nacalai オンラインカタログへ

Xylene
(#36612-93)



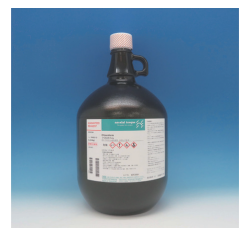
Nacalai オンラインカタログへ

D-Limonene
(#09480-21)



Nacalai オンラインカタログへ

Chloroform
(#08402-13)



Nacalai オンラインカタログへ

組織切片作製(包埋)

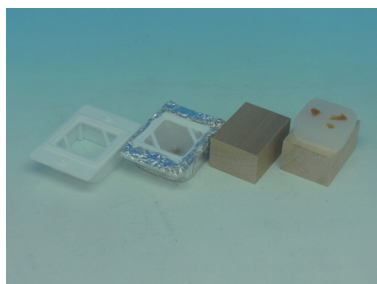
包埋

組織中の細胞を見やすくするためには、組織を薄く切る必要があります。しかし、組織には柔軟性や硬度のばらつきや間隙が存在するため、均等な厚みの切片を薄く切ることは困難です。従って、切片作製のためには一定の硬度を持たせる包埋という操作が必要となります。

実験プロトコール

パラフィン包埋

- ① キシレンで脱水後、キシレン：パラフィン=1：1にした混合液で、数時間から一晩(40~50℃)保温器の中で浸しておきます。
* タレット状で扱いやすいパラフィン系包埋剤のPARAHISTOも販売しています。本製品は、組織と馴染みやすいように高分子が添加されており、この操作は必要ありません。
 - ② 融解したパラフィン(60~65℃)に浸し、融解温度で加熱します。約1~2時間ごとにパラフィンを交換します(3回程度)。置換を十分に行った後、ゆっくりと固化させます。
- 注) パラフィンを浸透させている際、空気が入らないように注意してください。1時間後にゆるるなどで空気が入っていないことを確認してください。
* キシレンはD-リモネンに代替可能です(6ページ参照)。



パラフィン包埋サンプル作成時に使用する器具
最右はマウス小腸をパラフィンに包埋したものを台木に固定したものです。これを次ページのミクロトームに設置し切片を作製します。

凍結切片の包埋

- ① 固定試料を凍結包埋する場合、OCT コンパウンドに入れる際に急に脱水されることを防ぐため、あらかじめ10~20% スクロースに段階的に浸しておきます。
例) 10% Sucrose in 1 x PBS 1時間(室温)
15% Sucrose in 1 x PBS 1時間(室温)
20% Sucrose in 1 x PBS 1時間(室温)
- ② OCT コンパウンドを容器に注ぎ、試料を一度なじませます。
- ③ OCT コンパウンドを別の容器(クリオモールドなど)に注ぎ、なじませた試料を入れます。
- ④ イソペンタンを注いだ容器を液体窒素に浮かべます。
- ⑤ イソペンタンが十分に冷えたら、試料が入った容器をイソペンタン上に浮かべ包埋します。

Paraffin
(#26031-55)



Nacalai オンラインカタログへ

PARAHISTO mp 56~58℃
(#26142-21)



Nacalai オンラインカタログへ

パラフィン・キシレンと比較してパラフィン・リモネンの場合、少し温度を高めにししないとパラフィンが溶けない場合があります。

固定を行わない試料はタンパク質や核酸の分解を少しでも抑えるため、なるべく早くOCTコンパウンドに入れて凍結させてください。



試料の包埋中に気泡が入ると、切片にひびやスライドガラスからの剥離が起こる場合があります。包埋の際は気泡が試料につかないように気を付けてください。

組織切片作製(切片の作製)

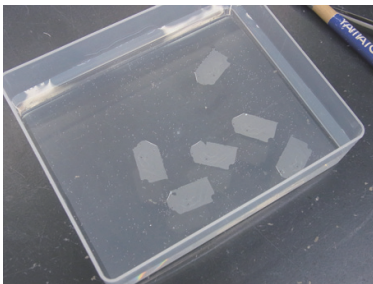
切片の作製

パラフィン切片作製用マイクロトーム

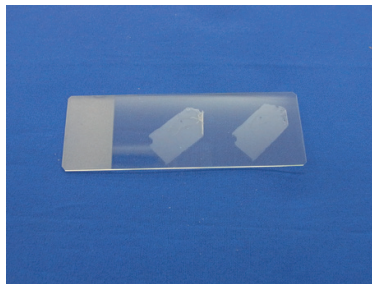
ヒトや動物などの組織を顕微鏡で観察するためには、試料を均一かつ極めて薄く切り出し、スライドガラス標本を作製する必要があります。マイクロトームはこの一連の操作で、“薄く切る”ための道具です。マイクロトームには以下の2種類があります。

回転式	滑走式
	
<p>マイクロトーム刀を固定し、器械の側面にあるハンドルを手で回転すると、1回転毎に目盛りに表示された厚さ(μm)毎に水平移動軸が前進します。ブロックは水平移動の先端に取り付けられ、上下動しながら刃に接近し、ブロックが刃に触れて切れます。厚さが一定した連続切片作製に適しています。</p>	<p>薄切する組織片のブロックを固定し、マイクロトーム刀の滑走路を動かして薄切します。非常に薄い切片の作製に適しています。</p>

・滑走式マイクロトームにより作製した切片



作製した切片



スライドガラスへの付着

左の写真のように、切片を1%酢酸水溶液に浸すことで、収縮した切片が広がり、スライドガラスへ付着させる操作が容易になります。

凍結切片作製用マイクロトーム(クライオスタット)

冷却装置が備え付けられているマイクロトームで、温度をコントロールできます。一般的に凍結切片を処理した時と同じ温度に設定します。



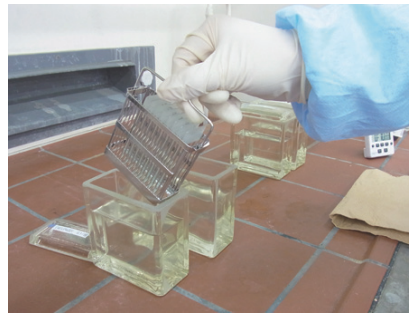
組織切片作製(切片の作製)

脱パラフィン処理

パラフィンは非水溶性です。抗体が組織に十分に浸透し、抗原抗体反応するためには、パラフィンを取り除く必要があります。

実験プロトコール

- ① キシレンの入った染色瓶(ドーゼ)にパラフィン切片を約5分浸漬します。この操作を合計で3回行います。
*キシレンはD-リモネンに代替可能です(6ページ参照)。
- ② 無水エタノールに5分浸漬します。この操作を合計で2回行います。
*無水エタノールはエタノールにモレキュラーシーブを加え一晩置いたものです。
*エタノールはヒストールに代替可能です(6ページ参照)。
- ③ 90% エタノールに5分浸漬します。
- ④ 80% エタノールに5分浸漬します。
- ⑤ 精製水に15分浸漬します。



スライドガラスを染色瓶の間を移動させる際は、前の液が次の液に混入しないように気を付けてください。

抗原の賦活化

抗原賦活化処理

抗原抗体反応は抗原の構造に依存しています。従って、固定処理や有機溶媒処理、パラフィン包埋などの過程によりタンパク質の三次元構造が修飾されると、特定の抗体による抗原の検出ができない場合があります。抗原賦活化の目的は固定化により生じた抗原の変化を元に戻すための操作です。抗原賦活化は架橋する固定化法で処理した組織において特に重要です。ホルマリン固定を行った抗原の約 85% が、抗原抗体反応を最適化するために何らかの抗原賦活化処理が必要とも言われています。抗原賦活化は一般的にポリクローナル抗体よりもモノクローナル抗体で必要とされます。抗原賦活化の方法は複数あり、ターゲットの抗原や抗体のタイプに依存します。

■ 主な抗原賦活化法

抗原賦活化法	説明
タンパク質分解酵素(プロテアーゼ)を使用する方法	トリプシン、プロテイナーゼ K、プロナーゼ、フィシン、ペプシンなどのプロテアーゼが用いられます。酵素分解により組織の形態やエピトープが破壊されるリスクがあり、酵素の種類や濃度、処理時間や温度を厳密に検討する必要があります。本手法はこのようなリスクに対して、賦活化が上手く進む抗原が少ない点が一つの問題とされています。
熱処理を行う方法	クエン酸緩衝液(pH6.0~7.0)、トリス塩酸緩衝液(pH9.0~11.0)、トリス EDTA 緩衝液、市販品などさまざまな賦活化溶液があります。この手法は、熱を加えることにより、ホルマリン固定により形成されたタンパク質の分子内や分子間のクロスリンク(メチレン架橋)を切断することにより、抗原性が賦活すると考えられています。

実験プロトコール

熱処理を行う方法の一つとして、弊社では抗原賦活化能に優れた試薬 HistoVT One を販売しています。以下に本製品を使用した抗原賦活化の操作を紹介します。

パラフィン切片の場合

- HistoVT One を染色瓶(ドーズ)に入れて温浴槽で 90℃ に加熱します。
*凍結切片の場合は 70℃ に加熱します。
- 脱パラフィンしたスライドガラスを①の溶液中に浸漬し、90℃ で 20 分、加熱します。
*凍結切片の場合は 70℃ で 20 分加熱します。
- HistoVT One を精製水、あるいは緩衝液(TBS もしくは PBS) で十分に洗浄します。この操作を 3 回行います。
- Blocking One Histo などを用いてブロッキングした後、抗原抗体反応を行ってください。
*ブロッキング処理については 12 ページをご参照ください。

Proteinase K(Recombinant) Solution
(#15679-06)



Nacalai オンラインカタログへ

HistoVT One(10x, pH 7.0)
(#06380-76)



Nacalai オンラインカタログへ

インキュベート時間は組織の種類により異なります。核内の物質を検出される際は 40 分加熱することを推奨します。

加熱により HistoVT One は白濁しますが、性能に問題はありません。

Tris Buffered Saline(10x)(pH 7.4)
(#12748-31)



Nacalai オンラインカタログへ

Phosphate Buffered Saline(10x)
(pH 7.4)
(#27575-31)



Nacalai オンラインカタログへ

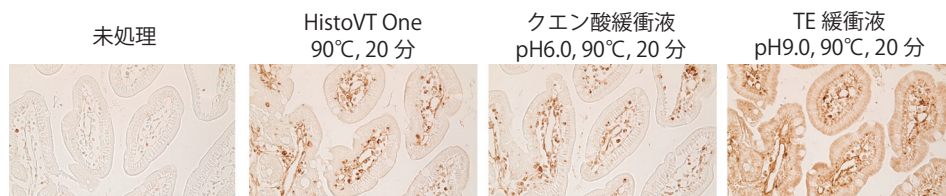
抗原の賦活化

実施例

以下に HistoVT One を用いた抗原賦活後の染色例を示します。

実施例 1

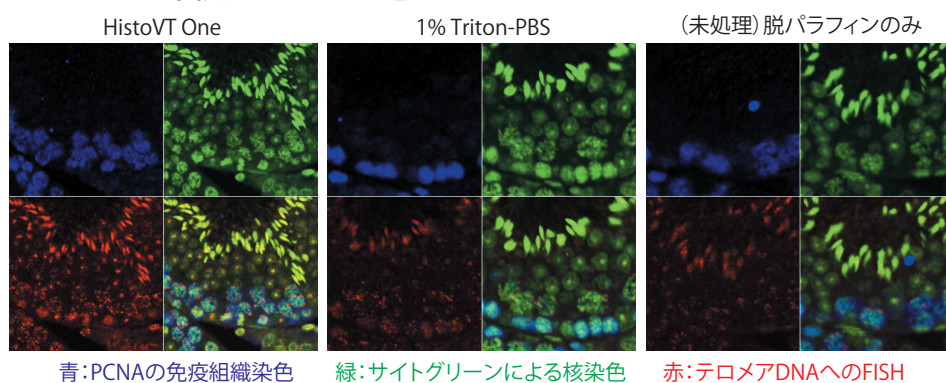
■ 他の賦活法との比較



マウス小腸パラフィン切片にて、Vimentin の検出を行いました。HistoVT One 処理により抗原性が賦活化されています。

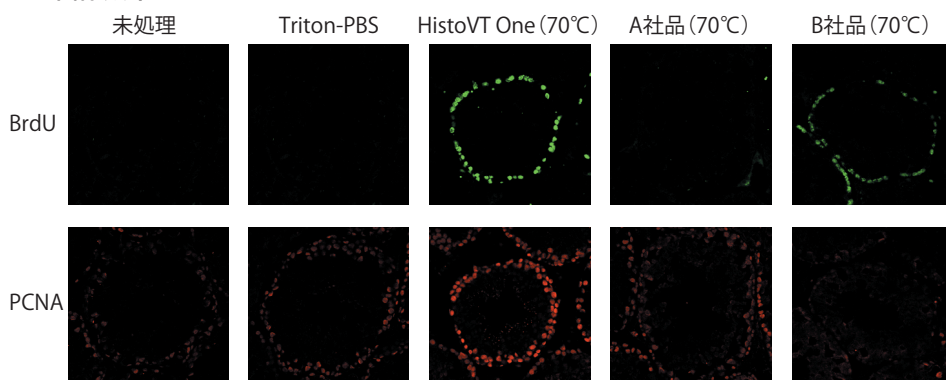
実施例 2

■ ホルマリン固定 - パラフィン包埋



実施例 3

■ 凍結切片



HistoVT One で処理すると、他の処理と比較して、顕著に抗原性が賦活化されています。

データご提供：独立行政法人 理化学研究所 脳科学総合研究センター
発生発達研究グループ

参考文献

- Ramos-Vara JA. *et al.* When tissue antigens and antibodies get along: revisiting the technical aspects of immunohistochemistry--the red, brown, and blue technique. *Vet Pathol.* 51(1), 42-87 (2014).

ブロッキング

ブロッキング

免疫組織染色では、さまざまなブロッキングが行われます。これらは主に二つに分類され、一方は抗体の非特異的吸着を抑制するためのブロッキングで、他方は検出や可視化システムに応じて実施する内在性因子のブロッキングになります。これらの例を以下の表にまとめます。

■ 種々のブロッキング法

ブロッキング法	効果	処理段階	備考
0.3% 過酸化水素 / メタノールまたは 3% 過酸化水素水	内在性のペルオキシダーゼ活性をブロック	抗原賦活処理前または処理後	細胞や凍結切片においては、抗原を破壊する可能性がある
1mM レバミゾール	内在性のアルカリホスファターゼ活性をブロック	酵素の基質溶液に添加	小腸のアルカリホスファターゼはブロッキングできない
内在性ビオチンのアビジンによる飽和	肝臓や腎臓で広く見られる内在性のビオチンをブロック	抗原賦活後、一次抗体の反応前	アビジン / ビオチン検出システムを使用する際のみ必要な処理
血清、イムノグロブリン、アルブミン、スキムミルク	一次抗体や標識二次抗体の非特異的なタンパク質相互作用をブロック	一般的に一次抗体の反応直前、または抗体希釈液に添加	ブロッキングに使用するタンパク質が検出系に影響を持たないか事前確認必要
塩濃度の増加	同上		150~300mmol/l の範囲で検討
0.1% Tween® または 0.1% Triton™ X 100		検出系で使用される試薬の希釈液や洗浄緩衝液に添加	検出時の感度低下が生じる

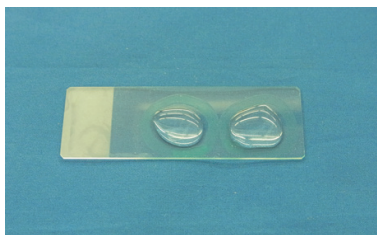
1. 抗体の非特異的吸着の抑制

非特異的な抗体の結合のブロッキングには血清やイムノグロブリン、アルブミン、スキムミルクなどが多く用いられます。血清を用いる場合は、二次抗体を産生した動物の正常血清を用いることで、二次抗体によるバックグラウンドも抑えられます。ブロッキング溶液の濃度や処理時間・温度は検討することが必要です。

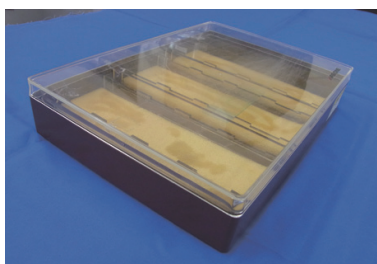
実験プロトコール

弊社では高分子ポリマーベースの強力なブロッキング剤 Blocking One Histo を販売しています。以下に本製品を使用したブロッキングの操作を紹介します。

① 撥水ペンでスライドガラス上の組織切片の周囲に撥水性の境界を作ります。



② 湿潤箱にスライドガラスを設置します。



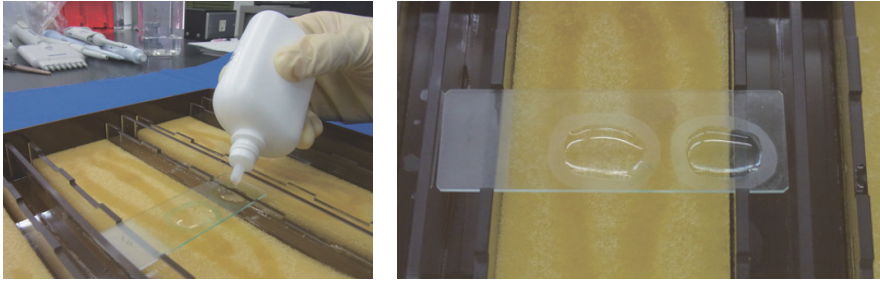
Blocking One Histo
(#06349-64)



Nacal オンラインカタログへ

ブロッキング

- ③ Blocking One Histo を組織全体が覆われるようにスライドガラスに滴下してください。



- ④ 室温で 5~10 分静置します。
 ⑤ ブロッキング溶液を除去し、t-TBS で組織を 5 分洗浄してください。

実施例

■ 蛍光染色：10% ヤギ血清とのブロッキング効率の比較

Blocking One Histo 処置 10 分	10% ヤギ血清処置 10 分

マウス小腸を抗 Vimentin 抗体で蛍光染色(データ中：緑色)しています。核は DAPI により青色に染色されています。10%ヤギ血清では小腸の輪郭にそって非特異な染色(白色矢印)が観察されますが、Blocking One Histo でブロッキングすると非特異な染色が抑えられています。

サンプル：マウス小腸パラフィン包埋切片
 抗原賦活：HistoVT One 90℃・20 分処置
 一次抗体：Anti-Vimentin rabbit polyclonal antibody (Santa Cruz：#sc-7557R)
 二次抗体：CF™ 488A Goat anti-Rabbit IgG (H+L), F(ab')₂ Fragment (Biotium：#20013)

t-PBS もご使用いただけます。
 t-PBSはPBSにTween® 20を0.1%もしくは0.05%になるよう添加し調製してください。ただしリン酸化抗体を用いる場合は、t-TBS を使用してください。

Tris Buffered Saline with 0.05%-Detergent(10x)(pH 7.4) [t-TBS;TBST] (#12749-21)



Nacalai オンラインカタログへ

Tris Buffered Saline with 0.1%-Detergent(10x)(pH 7.4) [t-TBS;TBST] (#12750-81)



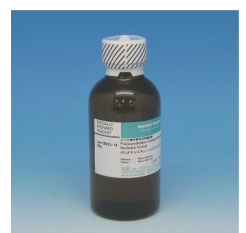
Nacalai オンラインカタログへ

Phosphate Buffered Saline(10x) (pH 7.4) (#27575-31)



Nacalai オンラインカタログへ

Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate [Tween® 20 相当品] (#28353-14)

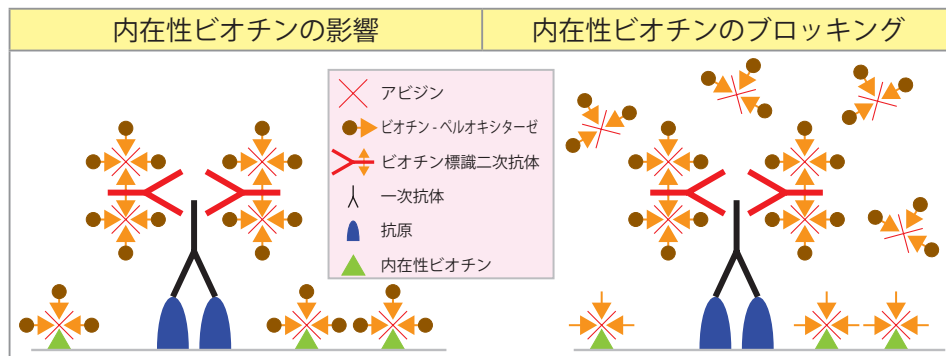


Nacalai オンラインカタログへ

ブロッキング

2. 内在性ビオチンのブロッキング

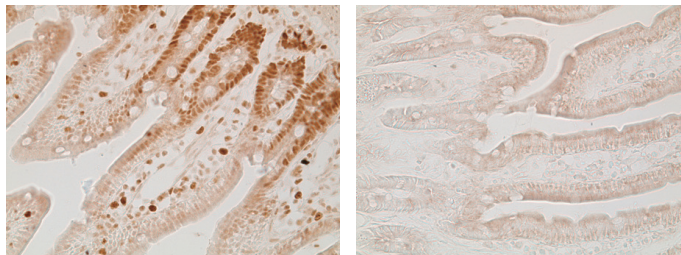
ビオチン-アビジンシステムを利用する場合、ビオチン標識された抗体とアビジン接合体(アビジン-HRP など)を用いて抗原を高感度に検出します。ビオチンはビタミンの一種で広く哺乳類の組織に存在しており、肝臓、脂肪、乳腺、腎臓などに高濃度で存在しています。ビオチン-アビジンシステムの場合、アビジン接合体が、内在性のビオチンに結合すると、偽陽性を生じます(下図参照)。これらの影響を回避するために、事前に組織切片をアビジンやビオチンで処理しておく必要があります。



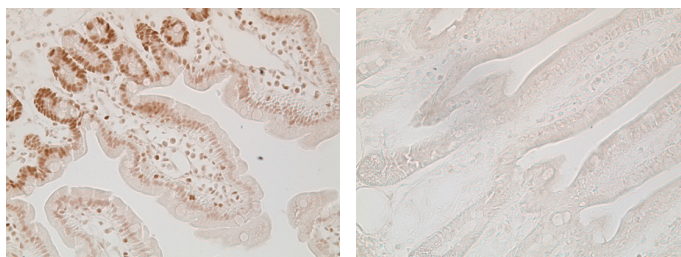
左図では、内在性のアビジン-ビオチン活性(EABA)の影響によりアビジン-ビオチンペルオキシダーゼが、非特異的に組織に結合しバックグラウンドを強く発します。右図では、EABA を非標識のアビジン-ビオチンを事前に添加し、非特異的な結合を抑制していることを示しています。

■ ブロッキング効果

凍結切片
ビオチンブロック無し



凍結切片
ビオチンブロック有り



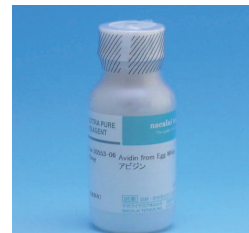
マウス小腸凍結切片にて、ABC 法により免疫組織染色を行った。ビオチンブロック未処理で観察されたバックグラウンドは、ビオチンブロック処理により改善されている。

実験プロトコール

以下に弊社試薬を用いた内在性ビオチンのブロッキングの操作を紹介します。

- ① Blocking One Histo でブロッキングした組織切片を 0.1% アビジン /TBS に室温で 10 分浸漬します。
- ② TBS に室温で 5 分浸漬し洗浄します。この操作を合計で 3 回行います。
- ③ 0.01% ビオチン /TBS に室温で 10 分浸漬します。
- ④ TBS に室温で 5 分浸漬し洗浄します。
*ブロッキング処理については 12 ページをご参照ください。

Avidin from Egg White
(#03553-06)



Nacalai オンラインカタログへ

Tris Buffered Saline(10x)(pH 7.4)
(#12748-31)



Nacalai オンラインカタログへ

D-Biotin [Vitamin H]
(#04822-04)



Nacalai オンラインカタログへ

ブロッキング

3. 内在性ペルオキシダーゼのブロッキング

ペルオキシダーゼを用いた検出系を利用する場合、内在性ペルオキシダーゼのブロッキングが必要になります。内在性のペルオキシダーゼ活性は、赤血球、顆粒球、神経など多くの細胞に存在しており、発色基質と反応し、偽陽性のシグナルが検出されます。固定化や包埋のプロセスは内在性の酵素活性を減少させます。しかし、酵素活性は残存しており、この活性をペルオキシダーゼなどの酸化剤を用いて完全にブロックする必要があります。

実験プロトコール

以下に弊社試薬を用いた内在性ペルオキシダーゼのブロッキングの操作を紹介します。

- ① 3% 過酸化水素水に室温で 15 分浸漬します。
- ② TBS に室温で 5 分浸漬し洗浄します。この操作を 3 回行います。

参考文献

- Warford A. *et al.* Antigen retrieval, blocking, detection and visualization systems in immunohistochemistry: A review and practical evaluation of tyramide and rolling circle amplification systems. *Methods*. 70(1), 28-33 (2014).

Hydrogen Peroxide(30%)
(#18411-25)



 Nacalai オンラインカタログへ

Tris Buffered Saline(10x)(pH 7.4)
(#12748-31)



 Nacalai オンラインカタログへ

発色検出

発色検出

抗原抗体反応は、抗体に何らかの標識が無いと可視化することはできません。最も一般的な標識は酵素標識であり、特にペルオキシダーゼやアルカリホスファターゼによる標識が一般的です。各酵素は特定の基質と反応し、発色性の沈殿物を生じます。酵素や発色基質の選択は、染色部位の特性など、さまざまな要因により選択されています。以下に代表的な標識酵素の発色基質と性質を示します。

■ 標識酵素と発色基質の一覧

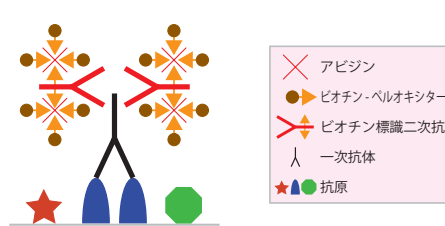
標識酵素	発色基質	色	適切な封入剤
ペルオキシダーゼ	AEC	れんが色	水溶性封入剤
	DAB	茶色	非水溶性封入剤
	DAB+Ni/Co	藍色	非水溶性封入剤
	TMB	青緑色	非水溶性封入剤
アルカリホスファターゼ	FastRed	濃い赤色	水溶性封入剤
	BCIP/NBT	濃い青色	水溶性封入剤
	New Fuchsin	濃い赤色	非水溶性封入剤

高感度検出

目的の抗原を検出する方法として、さまざまな検出方法や試薬が販売されています。ここではその一部について紹介します。

①アビジンビオチン法(ABC法)

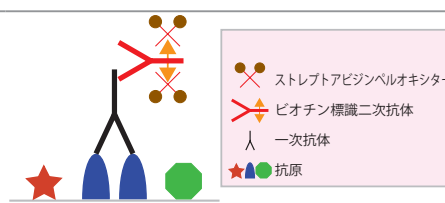
アビジンは卵白由来の糖タンパク質です。アビジンは低分子量ビタミンであるビオチンに高い親和性を示します。アビジン1分子は、4分子のビオチンと結合できます。本手法で最も一般的な方法は、アビジン-ビオチン複合体を用いた方法です。ビオチン標識された二次抗体に対して、酵素や蛍光色素(右図の例ではペルオキシダーゼ)標識されたビオチンとアビジンの複合体を反応させることで高感度に検出できます。



× アビジン
● ビオチン-ペルオキシダーゼ
× ビオチン標識二次抗体
人 一次抗体
★ ● 抗原

②ストレプトアビジンビオチン法(LSAB法)

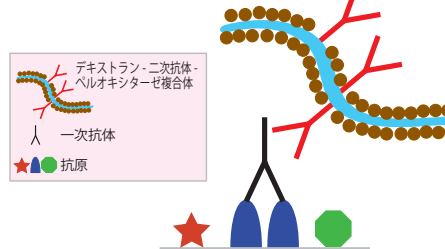
この方法はアビジンの代わりにストレプトアビジンを使用する方法です。ストレプトアビジンは、アビジンと異なり中性近辺に等電点を有し、レクチンと結合をしないことから、バックグラウンドを大幅に減少させることができます。



● ストレプトアビジンペルオキシダーゼ
× ビオチン標識二次抗体
人 一次抗体
★ ● 抗原

③ポリマー標識法

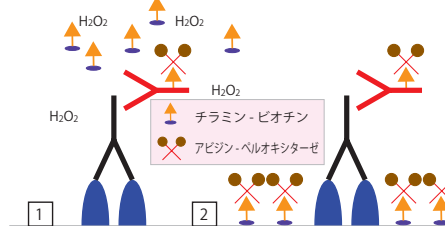
この方法は複数の二次抗体とペルオキシダーゼやアルカリホスファターゼなどの酵素(右図ではペルオキシダーゼ)が結合したポリマーを利用する方法です。本手法はアビジンビオチン法よりも、操作が簡単、高感度、内在性ビオチンの影響が無いなどの利点がありますがランニングコストは高価となります。



× デキストラン-二次抗体-ペルオキシダーゼ複合体
人 一次抗体
★ ● 抗原

④ TSA法

ペルオキシダーゼがチラミンと反応することで、反応性の高い中間体が形成され、近傍のチロシンに富むタンパク質に結合する性質を利用しています。図のように、ビオチン化されたチラミンは、抗原抗体反応の生じている部位でペルオキシダーゼと反応し、その近傍に蓄積します。操作はやや複雑ですが、アビジンビオチン法よりも、5~10倍高感度に検出できます。




▲ H_2O_2
× チラミン-ビオチン
● アビジン-ペルオキシダーゼ

⑤その他

弊社では、DABの感度を約2倍向上させるエンハンサー試薬 Metal Enhancer for DAB Stain や感度や抗体の特異性を向上させる抗体希釈液 Signal Enhancer HIKARI を用意しています。これらの試薬を用いることで、簡単に感度を向上させることができます。

Streptavidin Biotin Complex Peroxidase Kit (#30462-30)



Nacal オンラインカタログへ

Metal Enhancer for DAB Stain (#07388-24)



Nacal オンラインカタログへ

Signal Enhancer HIKARI for Immunostain Trial Set (#02363-71)



Nacal オンラインカタログへ

発色検出

1. ペルオキシダーゼ検出系 (LSAB 法)

実験プロトコール

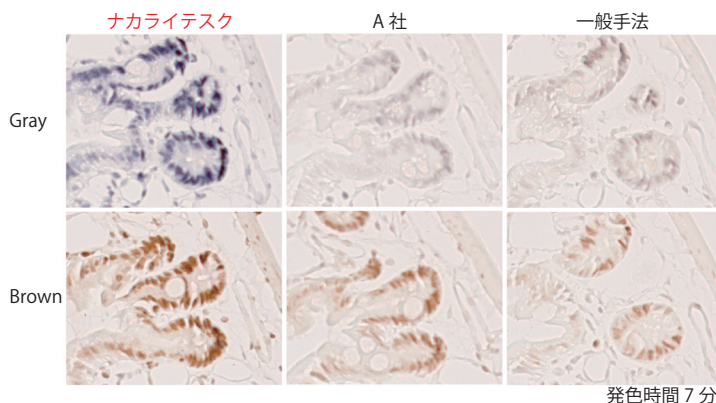
以下に弊社試薬を用いたペルオキシダーゼ検出 (LSAB 法) の操作を紹介します。

- ① 抗原賦活、ブロッキング処理を行った組織切片を t-TBS で 5 分洗浄します。
*抗原賦活については 10 ページ、ブロッキング処理については 12 ページをご参照ください。
- ② 一次抗体を t-TBS で希釈します。
*高感度検出を必要とされる場合は Signal Enhancer HIKARI を用いて希釈してください。
- ③ 希釈した一次抗体を切片に添加し、冷蔵でオーバーナイトインキュベーションします。反応後に t-TBS で軽くリンスします。さらに t-TBS で 5 分洗浄します。この洗浄操作を合計 3 回行います。
- ④ ビオチン標識された二次抗体を t-TBS で希釈します。
*高感度検出を必要とされる場合は Signal Enhancer HIKARI を用いて希釈してください。
- ⑤ 希釈した二次抗体を切片に添加し、室温で 1 時間インキュベーションします。反応後に t-TBS で軽くリンスします。さらに t-TBS で 5 分洗浄します。この洗浄操作を合計 3 回行います。
- ⑥ ストレプト ABC ペルオキシダーゼキットの容器 C に t-TBS を 5ml 添加します。これに A 液 (ストレプトアビジン溶液)、B 液 (ビオチン-ペルオキシダーゼ溶液) をそれぞれ 2 滴加え、容器 C のふたをして、転倒混和により混合し、30 分放置後使用します。
- ⑦ ⑤の切片に⑥で調製した溶液を数滴、滴下し、30 分反応させます。反応後に t-TBS で軽くリンスします。さらに t-TBS で 5 分洗浄します。この洗浄操作を合計 3 回行います。
- ⑧ 試験管に精製水もしくは DAB 染色用メタルエンハンサー 2ml を分取し、ペルオキシダーゼ染色 DAB キット (Brown Stain) の緩衝液 (イミダゾール緩衝液) 1 滴、発色原液 (ジアミノベンジジン溶液) 1 滴、基質試薬 (過酸化水素水) 1 滴をそれぞれ加えて十分に混和します。
- ⑨ ⑦の切片に⑧で調製した溶液を切片が完全に被われるように滴下します。適当な染色像が得られたら、水洗して反応を止めます。
- ⑩ 染色した組織の封入については、22 ページをご参照ください。

実施例

■ Metal Enhancer for DAB Stain による高感度検出

抗PCNA 抗体を用いたマウス小腸の免疫組織染色 (連続切片)



発色剤

ナカライテスク : (Gray) ペルオキシダーゼ染色 DAB キット (Brown stain) + Metal Enhancer for DAB (Brown) ペルオキシダーゼ染色 DAB キット (Brown stain)

A 社 : (Gray) キット品使用 (キット付属ニッケル水溶液添加)
(Brown) キット品使用 (キット付属ニッケル水溶液未添加)

一般手法 : (Gray) 0.6mg/ml DAB, 0.03% H₂O₂, 50mM Tris-HCl Buffer pH7.6, 0.03% NiCl₂
(Brown) 0.6mg/ml DAB, 0.03% H₂O₂, 50mM Tris-HCl Buffer pH7.6

DAB 染色用メタルエンハンサーを併用することで、高感度に染色 (Gray) できています。Brown に染色 (エンハンサーなし) の場合でも他社製品よりも高感度な結果が得られています。

Streptavidin Biotin Complex Peroxidase Kit (#30462-30)



Nacalai オンラインカタログへ

Metal Enhancer for DAB Stain (#07388-24)



Nacalai オンラインカタログへ

Peroxidase Stain DAB Kit (Brown Stain) (#25985-50)



Nacalai オンラインカタログへ

t-TBS もご使用いただけます。ただし、リン酸化抗体を用いる場合は、t-TBS を使用してください。

Tris Buffered Saline with 0.1%-Detergent(10x)(pH 7.4) [t-TBS;TBST] (#12750-81)



Nacalai オンラインカタログへ

Tris Buffered Saline with 0.05%-Detergent(10x)(pH 7.4) [t-TBS;TBST] (#12749-21)

Nacalai オンラインカタログへ

発色検出

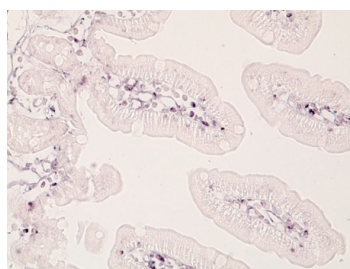
2. アルカリホスファターゼ検出系

実験プロトコール

以下に弊社試薬を用いたアルカリホスファターゼ検出の操作を紹介します。

- ① 抗原賦活、ブロッキング処理を行った組織切片を t-TBS で 5 分洗浄します。
*抗原賦活については 10 ページ、ブロッキング処理については 12 ページをご参照ください。
- ② 一次抗体を t-TBS で希釈します。
*高感度検出を必要とされる場合は Signal Enhancer HIKARI を用いて希釈してください(16 ページ参照)。
- ③ 希釈した一次抗体を切片に添加し、冷蔵でオーバーナイトインキュベーションします。反応後に t-TBS で軽くリンスします。さらに t-TBS で 5 分洗浄します。この洗浄操作を合計 3 回行います。
- ④ アルカリホスファターゼ標識された二次抗体を t-TBS で希釈します。
*高感度検出を必要とされる場合は Signal Enhancer HIKARI を用いて希釈してください(16 ページ参照)。
- ⑤ 希釈した二次抗体を切片に添加し、室温で 1 時間インキュベーションします。反応後に t-TBS で軽くリンスします。さらに t-TBS で 5 分洗浄します。この洗浄操作を合計 3 回行います。
- ⑥ BCIP-NBT キットの緩衝液(トリス緩衝液)をメスシリンダーに 5ml 取り、発色原液(BCIP/NBT 溶液)を 0.05ml 添加し十分に混和してください。
- ⑦ ⑤の切片に⑥で調製した溶液を切片が完全に被われるように滴下します。適当な染色像が得られたら、水洗して反応を止めます。

実施例



マウス小腸を BCIP/NBT 染色キットにより染色

- サンプル : マウス小腸
抗原賦活 : HistoVT One (#06380)
ブロッキング : Blocking One Histo (#06349-64)
一次抗体 : Anti-Vimentin Rabbit polyclonal antibody(Santa Cruz #sc-7557-R) 500 倍希釈
二次抗体 : アルカリホスファターゼ標識 Anti-Rabbit IgG (Santa Cruz #sc-2057) 1,000 倍希釈

参考文献

- Ramos-Vara JA. *et al.* When tissue antigens and antibodies get along: revisiting the technical aspects of immunohistochemistry--the red, brown, and blue technique. *Vet Pathol.* 51(1), 42-87 (2014).

アルカリホスファターゼ標識抗体を反応させた後の組織切片洗浄に、t-PBS を使用することはできません。アルカリホスファターゼがりん酸と反応することにより酵素活性を失います。組織切片の洗浄は、t-TBS で行ってください。

Tris Buffered Saline with
0.1%-Detergent(10x)(pH 7.4)
[t-TBS;TBST] (#12750-81)



Nacalai オンラインカタログへ

Tris Buffered Saline with
0.05%-Detergent(10x)(pH 7.4)
[t-TBS;TBST] (#12749-21)



Nacalai オンラインカタログへ

BCIP-NBT Solution Kit for
Alkaline Phosphatase Stain,
Nuclease tested (#03937-60)



Nacalai オンラインカタログへ

蛍光検出

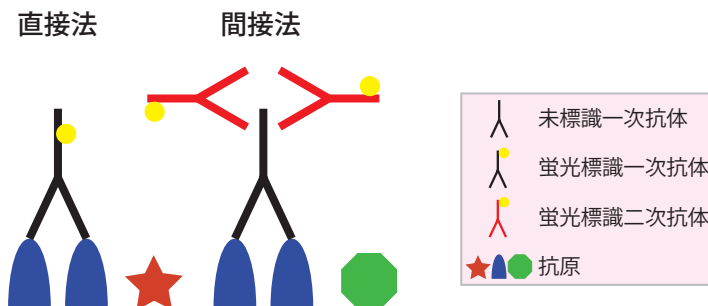
1. 蛍光検出

前述の発色検出法と蛍光検出法には以下のような相違点があります。

■ 蛍光検出法と発色検出法の違い

	蛍光検出法	発色検出法
標識物質	FITC、Cy™3、Cy™5、CF™ Dye、Alexa Fluor® 系色素など	・DAB や TMB などの発色色素(ペルオキシダーゼ検出系) ・NBT/BCIP などの発色色素(アルカリホスファターゼ検出系)
定量性	優れる(抗原量と蛍光量の相関がある)	劣る(抗原量と発色基質の量に相関があまり無い)
顕微鏡	蛍光顕微鏡や共焦点顕微鏡(光学顕微鏡よりも一般的に高価)	光学顕微鏡や電子顕微鏡
組織構築の把握	暗視野であり組織構築の全体像の把握が困難	明視野であり組織構築の全体像の把握が容易
標本の保存	長期保管不可(蛍光の退色による)	長期保管可能
多重染色	可能(染色工程が不要で簡単)	可能(染色工程が複数となり蛍光抗体法よりも複雑)
局在解析	細胞レベルでの局在解析が可能	組織レベルでの局在解析が可能
操作性	酵素抗体法よりも簡単(内在性酵素のブロッキングや染色の操作が不要) *自家蛍光による影響を受ける場合は処理が必要(次ページ参照)	ペルオキシダーゼやアルカリホスファターゼなど内在性酵素のブロッキングが必要

蛍光を用いた免疫組織染色は、蛍光標識された一次抗体を用いる直接法と蛍光標識された二次抗体を用いる間接法がありますが、現在は間接法が広く普及しています。間接法は直接法と比較し、蛍光標識された二次抗体が一次抗体に複数結合することから高感度に検出できる点や、二次抗体のみが標識されていることから、コスト面でも優位性があります。



実験プロトコール

以下に弊社試薬と高輝度かつ退色耐久性に優れた色素の Biotium 社 CF™ Dye を用いた蛍光染色の操作について紹介します。

- ① 抗原賦活、ブロッキング処理を行った組織切片を t-TBS で 5 分洗浄します。
*抗原賦活については 10 ページ、ブロッキング処理については 12 ページをご参照ください。
- ② 一次抗体を t-TBS で希釈します。
*高感度検出を必要とされる場合は Signal Enhancer HIKARI を用いて希釈してください(16 ページ参照)。
- ③ 希釈した一次抗体を切片に添加し、冷蔵でオーバーナイトインキュベーションします。反応後に t-TBS で 5 分洗浄します。この操作を 3 回行います。
- ④ CF™ Dye 標識二次抗体を t-TBS で希釈します。
*高感度検出を必要とされる場合は Signal Enhancer HIKARI を用いて希釈してください(16 ページ参照)。
- ⑤ 希釈した CF Dye 標識二次抗体を切片に添加し、室温で 1 時間インキュベーションします。反応後に t-TBS で 5 分洗浄します。この操作を 3 回行った後、TBS でリンスします。
- ⑥ 退色防止剤含有封入剤で封入後、蛍光顕微鏡で観察します。
*封入については 22 ページをご参照ください。

t-PBS もご使用いただけます。ただし、リン酸化抗体を用いる場合は、t-TBS を使用してください。

Tris Buffered Saline with 0.1%-Detergent(10x)(pH 7.4) [t-TBS;TBST] (#12750-81)



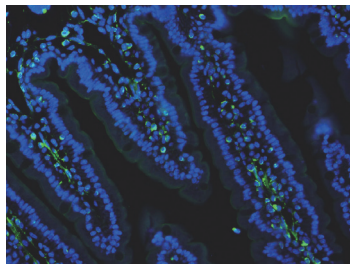
Nacalai オンラインカタログへ

Tris Buffered Saline with 0.05%-Detergent(10x)(pH 7.4) [t-TBS;TBST] (#12749-21)

Nacalai オンラインカタログへ

蛍光検出

実施例



サンプル : マウス小腸
抗原賦活 : HistoVT One (#06380)
ブロッキング : Blocking One Histo (#06349-64)
一次抗体 : Anti-Vimentin Rabbit Polyclonal Antibody (Santa Cruz #sc-7557R)
二次抗体 : CF™ 488A Goat Anti-Rabbit IgG (H+L), F(ab)₂ Fragment (Biotium #20013)
封入剤 : Fluoro-KEEPER Antifade Reagent, Non-Hardening Type with DAPI (#12745-74)

2. 自家蛍光の抑制

蛍光検出の結果の解釈は、自家蛍光と呼ばれる試料中に含まれる蛍光を発する物質によって、誤りが生じる場合があります。エラスチン、フィブロネクチン、リポフスチン、カテコールアミンなどさまざまな物質が自家蛍光を発します。例えば、リポフスチンは加齢に伴い細胞に蓄積する物質で、自家蛍光を強く発するため組織の蛍光観察を難しくしています。リポフスチンの影響を抑えるためには、スタンブラック B が使用されています。最近ではバックグラウンドが高くなるスタンブラック B の短所を補う高性能の試薬も市販されています。

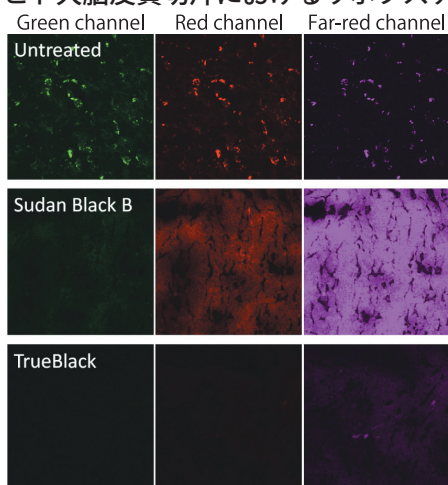
実験プロトコール

リポフスチンの自家蛍光を抑制する Biotium 社 TrueBlack™ Lipofuscin Autofluorescence Quencher を用いた自家蛍光の抑制の操作について紹介します。

- ① 組織切片の免疫蛍光染色を実施してください。
- ② 本製品に 70% エタノールを 20 倍量添加し良くボルテックスしてください。
- ③ 蛍光染色実施後のスライドガラスから、スライドガラスのタッピングやキムワイプ® の使用により過剰の洗浄緩衝液を除去してください。
- ④ 水平な場所(例: 湿潤箱)にスライドガラスを置き、直ぐに②で調製した本製品を完全に切片を覆う程度(約 100~200 μl)添加してください。30 秒後に本製品を除去します。
- ⑤ スライドガラスを染色ジャーに入れ、PBS により 3 回洗浄してください。
- ⑥ 退色防止剤含有封入剤で封入後、蛍光顕微鏡で観察します。

実施例

■ ヒト大脳皮質切片におけるリポフスチン自家蛍光



上段(未処理) :
切片全体でリポフスチンの強い蛍光が三つ全てのチャンネルで認められる。

中段(スタンブラック B) :
リポフスチンの自家蛍光を抑制しているが Red と Far-red のチャンネルでバックグラウンドが高くなっている。

下段(TrueBlack™) :
低いバックグラウンドでリポフスチンの自家蛍光を抑制している。

参考文献

- Viegas MS. *et al.* An improved and cost-effective methodology for the reduction of autofluorescence in direct immunofluorescence studies on formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Eur J Histochem.* 51(1), 59-66 (2007).

TrueBlack™ Lipofuscin
Autofluorescence Quencher,
20x in DMF
(#58889-71)

Nacal オンラインカタログへ

ヘマトキシリン - エオジン染色

ヘマトキシリン - エオジン染色

ヘマトキシリン - エオジン染色は、免疫組織化学で汎用的に良く使用される染色法です。ヘマトキシリンは核を青色に染色し、エオジンは細胞質やコラーゲンなどを赤色に染色します。この染色方法により、細胞および組織全体の構造を確認することができます。ヘマトキシリンには、複数の染色方法がありますが、以下では汎用的なマイヤーのヘマトキシリン液を使用した染色方法を紹介いたします。

実験プロトコール

以下に弊社試薬を用いたヘマトキシリン - エオジン染色の操作を紹介いたします。

① 試薬の調製

・マイヤーのヘマトキシリン溶液

ヘマトキシリンは溶解し難いので、少量(10ml程度)のエタノールに事前に溶解した後、約500mlの精製水に加えます。また、カリウムミョウバンも溶解し難いことから、別の約500mlの精製水に溶解します。これらの溶液を混合後、残りの試薬を添加し溶解します。

ヘマトキシリン	1 g	カリウムミョウバン	50 g
精製水	1 L	抱水クロラル	50 g
ヨウ素酸ナトリウム	0.2 g	結晶クエン酸	1.0 g

・1% エオジン Y・アルコール溶液(保存液)

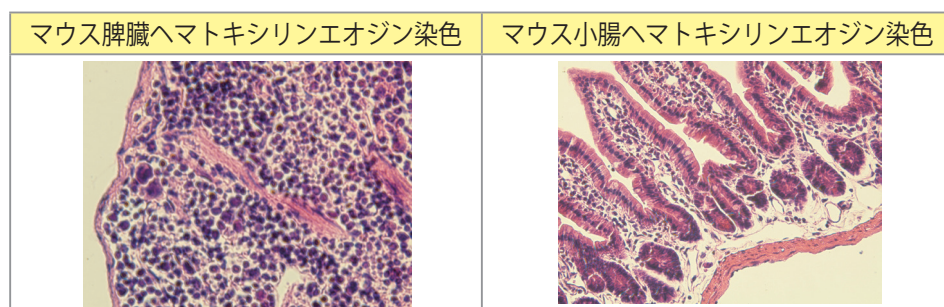
精製水にエオジン Y を溶解後、エタノール 80ml を添加し攪拌します。

エオジン Y	1 g
精製水	20 ml
エタノール	80 ml

*使用時は、保存液を 80% エタノールと 1 : 3 で混合し、少量の酢酸を添加したものを使用します(例：保存液 2ml、80% エタノール 6ml、酢酸 40 μ l)。

- ② 脱パラフィン処理した標本をヘマトキシリン液の入った染色瓶(ドーゼ)に浸漬し、1~5分程度反応させます。
*脱パラフィン処理については9ページをご参照ください。
- ③ 5分程度流水で水洗した後、エオジン溶液と5~10分程度反応させた後、精製水でリンスします。
- ④ 90% エタノールに約1分浸漬します。
*エタノールはヒストールに代替可能です(6ページ参照)。
- ⑤ 95% エタノールに約1分浸漬します。この操作を合計2回行います。
- ⑥ 無水エタノールに浸漬し、顕微鏡を見ながら適切な所まで色を抜きます。
*無水エタノールはエタノールにモレキュラーシーブを加え一晩置いたものです。
- ⑦ 無水エタノールに約1分浸漬します。この操作を合計2回行います。
- ⑧ キシレンに約5分浸漬します。この操作を合計2回行います。
*キシレンはD-リモネンに代替可能です(6ページ参照)。
- ⑨ 非水溶性封入剤で封入します。
*封入については22ページをご参照ください。

実施例

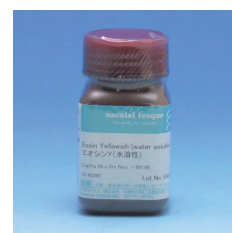


Hematoxylin for Biological Stain
(#17539-34)



Nacalai オンラインカタログへ

Eosin Yellowish(water soluble)
(#14410-42)



Nacalai オンラインカタログへ

封入

封入

封入は作製した標本を保護するために行います。封入剤には非水溶性と水溶性の2種類のタイプがあります。蛍光色素は主に水溶性の封入剤を使用し、発色基質は基質の水溶性、非水溶性の性質に応じて、水溶性封入剤と非水溶性封入剤を使い分けます。封入剤は市販品も充実しており、長期間の保管が可能な固化するタイプや退色防止剤の含まれているものなどさまざまなタイプが販売されています。

■ 封入剤の選択

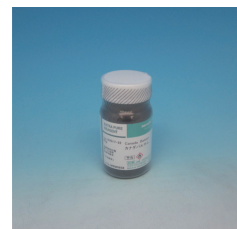
染色法	色素	色	適切な封入剤
ペルオキシダーゼ染色	AEC	れんが色	水溶性封入剤
	DAB	茶色	非水溶性封入剤
	DAB+Ni/Co	藍色	非水溶性封入剤
	TMB	青緑色	非水溶性封入剤
アルカリホスファターゼ染色	FastRed	濃い赤色	水溶性封入剤
	BCIP/NBT	濃い青色	水溶性封入剤
	New Fuchsin	濃い赤色	非水溶性封入剤
ヘマトキシリン - エオジン染色	Hematoxylin	青色	非水溶性封入剤
	Eosin Y	赤色	非水溶性封入剤
蛍光染色	Alexa Fluor®, FITC、CF™ Dye など	蛍光	水溶性封入剤

1. 非水溶性封入剤での封入(例：DAB 染色後)

実験プロトコール

- ① 70%エタノールの入った染色瓶(ドーゼ)に DAB 染色後の試料を約 2~5 分浸漬します。
*エタノールはヒストールに代替可能です(6ページ参照)。
- ② 80%エタノールに①の標本を約 2~5 分浸漬します。
- ③ 90%エタノールに②の標本を約 2~5 分浸漬します。
- ④ 95%エタノールに③の標本を約 2~5 分浸漬します。
- ⑤ 無水エタノールに④の標本を約 5 分浸漬します。この操作を合計 3 回行います。
*無水エタノールはエタノールにモレキュラーシーブを加え一晩置いたものです。
- ⑥ キシレンの入った染色瓶に⑤の標本を約 10 分浸漬します。この操作を合計 2 回行います。
*キシレンは D-リモネンに代替可能です(6ページ参照)。
- ⑦ 標本から余分な液を取り除き、カナダバルサム(非水溶性封入剤)を1~2 滴ほど滴下します。
- ⑧ 標本をカバーガラスによりカバーした後、マニキュアなどでカバーガラスを固定します。

Canada Balsam
(#07017-32)



 Nacalai オンラインカタログへ

封入

2. 水溶性封入剤での封入(例：蛍光染色後)

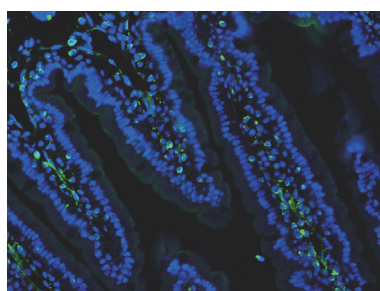
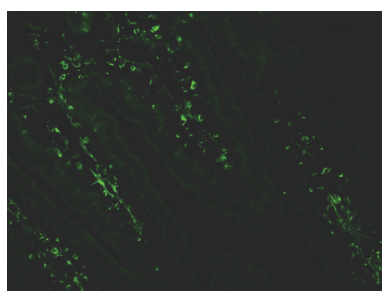
実験プロトコール

弊社では蛍光顕微鏡観察時に起こる蛍光の急激な退色を防止する水溶性封入剤 Fluoro-KEEPER Antifade Reagent を販売しています。以下は本製品を用いた実施例です。

- ① 蛍光標識抗体を反応させた標本から余分な液を取り除き、水溶性封入剤を 1～2 滴ほど滴下します。
- ② 標本をカバーガラスによりカバーした後、マニキュアなどでカバーガラスを固定します。直ぐに顕微鏡観察が可能です。

実施例

マウス小腸を Fluoro-KEEPER Antifade Reagent の DAPI 不含(データ左)と含有(データ右)で封入したサンプルの蛍光顕微鏡での観察結果



- サンプル : マウス小腸
抗原賦活 : HistoVT One (#06380)
ブロッキング : Blocking One Histo (#06349-64)
一次抗体 : Anti-Vimentin Rabbit Polyclonal Antibody (Santa Cruz #sc-7557R)
二次抗体 : CF™ 488A Goat Anti-Rabbit IgG (H+L), F(ab)₂ Fragment (Biotium #20013)

Fluoro-KEEPER Antifade Reagent,
Non-Hardening Type
(#12593-64)



 [Nacalai オンラインカタログへ](#)

Fluoro-KEEPER Antifade Reagent,
Non-Hardening Type with DAPI
(#12745-74)



 [Nacalai オンラインカタログへ](#)

ご注意 試験・研究用以外には使用しないでください。

※掲載内容は予告なく変更になる場合があります。

ナカライテスク株式会社

■販売取扱店

〒604-0855 京都市中京区二条通烏丸西入東玉屋町 498

ウェブサイト

<https://www.nacalai.co.jp/>

価格・納期のご照会

試験はここに
0120-489-552

製品に関する技術的なご照会

<https://www.nacalai.co.jp/ss/Contact/>
TEL:075-211-2703

分類	製品名	規格・ メーカー名	メーカー 製品番号	製品番号	容量	価格
固定	10% -Formaldehyde Neutral Buffer Solution 劇	-	-	37152-51	1 L	2,500
				37152-64	10 L	10,300
	4%-Paraformaldehyde Phosphate Buffer Solution 劇	SP	-	09154-14	5 X 10 mL	4,400
				09154-56	100 mL	2,200
				09154-85	500 mL	2,900
Zinc Formalin Fixative, pH 6.25 劇	Polysciences	21516-3.75	37679-84	3.75 L	28,000	
脱水・置換	Chloroform 純度 \geq 99.0%(GC) 劇	JIS 試薬特級	-	08402-84	100 mL	1,300
				08402-55	500 mL	1,630
				08402-13	3 L	7,200
	Histol	SP	-	18167-74	18 L	14,600
				D-Limonene	SP	-
	Xylene 純度 \geq 90%(GC) 劇	GR	-	36612-35	500 mL	1,230
				36612-93	3 L	5,250
包埋	PARAHISTO mp56 \sim 58 $^{\circ}$ C	SP	-	26142-21	1kg	2,600
	Paraffin mp56 \sim 58 $^{\circ}$ C (板状)	SP	-	26031-55	500 g	3,450
抗原賦活剤	HistoVT One(10x, pH 7.0)	SP	-	06380-76	100 mL	4,900
				06380-05	500 mL	18,900
	Proteinase K(Recombinant) Solution	SP	-	15679-06	2 mL	8,800
ブロッキング	Blocking One Histo	SP	-	06349-64	50 mL	9,000
	Avidin from Egg White	EP	-	03553-06	10 mg	5,650
	D-Biotin	GR	-	04822-04	100 mg	2,500
	Hydrogen Peroxide(30%) 劇	EP	-	18411-25	500g	880
発色検出	Peroxidase Stain DAB Kit(Brown Stain)	SP	-	25985-50	1 kit	17,000
	BCIP-NBT Solution-Kit for Alkaline Phosphatase Stain, Nuclease tested	SP	-	03937-60	1-kit	13,500
	【代替品】 BCIP-NBT Solution(Ready To Use)	SP	-	19880-84	100 mL	10,000
発色検出 (高感度化)	Streptavidin Biotin Complex Peroxidase Kit	SP	-	30462-30	1 kit	27,000
	Metal Enhancer for DAB Stain	SP	-	07388-24	100 mL	4,300
	Signal Enhancer HIKARI for Immunostain Trial Set	SP	-	02363-71	1 set	12,000
	Signal Enhancer HIKARI for Immunostain Solution A	SP	-	02373-54	20 mL	30,000
	Signal Enhancer HIKARI for Immunostain Solution B	SP	-	02375-34	20 mL	30,000
自家蛍光の抑制	TrueBlack Lipofuscin Autofluorescence Quencher, 20X in DMF	Biotium	23007	58889-71	1 mL	35,000
ヘマトキシリン-エオジン染色	Hematoxylin for Biological Stain	GR	-	17539-34	5g	6,600
				17539-92	25g	23,000
封入(非水溶性封入剤)	Canada Balsam	EP	-	07017-32	25g	2,000
				07017-45	500g	6,800
封入(水溶性封入剤)	Fluoro-KEEPER Antifade Reagent, Non-Hardening Type with DAPI	SP	-	12745-74	2 X 5 mL	19,500
	Fluoro-KEEPER Antifade Reagent, Non-Hardening Type	SP	-	12593-64	2 X 5 mL	17,500

分類	製品名	規格・メーカー名	メーカー製品番号	製品番号	容量	価格
その他	Phosphate Buffered Saline(10x)(pH 7.4)	—	—	27575-31	1 L	5,200
	Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate	SP	—	28353-14	50 g	2,450
	TBS(10x)(pH 7.4)	SP	—	12748-31	1 L	7,000
	0.05%-tTBS(10x)(pH 7.4)	SP	—	12749-34	100 mL	2,100
				12749-21	1 L	8,700
0.1%-tTBS(10x)(pH 7.4)	SP	—	12750-81	1 L	8,900	

ご注意 試験・研究用以外には使用しないでください。

※掲載内容は予告なく変更になる場合があります。

※掲載価格は2023年4月現在のものです(消費税は含まれていません)。

ナカライテスク株式会社

■販売取扱店

〒604-0855 京都市中京区二条通烏丸西入東玉屋町 498

URL <https://www.nacalai.co.jp/>

価格・納期のご照会

試験はここに
0120-489-552

製品に関する技術的なご照会

<https://www.nacalai.co.jp/ss/Contact/>
TEL:075-211-2703