

免疫組織染色手順 (オートクレーブ前処理)

1. 脱パラフィン 30 分
2. 脱キシレン
3. 内因性ペルオキシダーゼ処理：メタノール中 0.3 % H₂O₂ 溶液 室温 30 分
4. 80 % エタノール→70 % エタノール→60 % エタノール→流水洗浄 1 分
5. オートクレーブ処理* 110 °C 10 分 (10 mM クエン酸緩衝液, pH 6.0)
6. 放置冷却
7. 流水洗浄 3 分
8. TBS-T にて軽くリンス洗浄
9. 正常血清ブロッキング処理：室温 30 分
Goat Whole Serum (IBL #17301)を 5 %に希釈して使用 (※2 次抗体の動物血清を使用)
10. TBS-T にて軽くリンス洗浄
11. 1 次抗体反応：4 °C 一昼夜インキュベーション
※組織の固定条件や用いる組織により反応条件が異なる場合がありますので、各施設での設定をおすすめ致します
12. TBS-T 洗浄 5 分×3 回
13. 2 次抗体反応：室温 30 分
一次抗体がウサギポリクローナル抗体の場合：
Anti-Rabbit IgG (H+L) Goat IgG-Biotin (IBL #17542) 10 µg/mL
一次抗体がマウスモノクローナル抗体の場合：
Anti-Mouse IgG (H+L) Goat IgG-Biotin (IBL#17641) 10 µg/mL
14. TBS-T 洗浄 5 分×3 回
15. ABC 試薬の反応：室温 30 分 (Vectastain ABC Kit, PEROXIDASE STANDARD PK-4000)
16. TBS-T 洗浄 5 分×3 回
17. 発色：室温 1-10 分
(DAB "DOJINDO 349-00903" 30 mg, 30 % H₂O₂ 25 µL/50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mL)
18. 流水洗浄 3 分
19. 核染色 (ヘマトキシリン)
20. 色出し 5 分
21. 脱水
22. 透徹
23. 封入

* オートクレーブ処理

500 mL ビーカーにクエン酸緩衝液を 500 mL 入れ、組織切片をバスケットごと浸け、オートクレーブにかける。

10 mM クエン酸緩衝液(pH 6.0)の調製

- ① クエン酸 C₃H₄(OH)(COOH)₃/H₂O = 210.14 2.1 g を 900 mL の精製水に溶解する
- ② 水酸化ナトリウム液にて pH 6.0 に調節する。(2M-NaOH でおおよそ 13 mL 加える)
- ③ さらに精製水を加え、1,000 mL にメスアップする