

<目次>

免疫組織染色手順 (前処理なし) p2

免疫組織染色手順 (マイクロウェーブ前処理) p3

免疫組織染色手順 (オートクレーブ前処理) p4

免疫組織染色手順 (トリプシン前処理) p5

免疫組織染色手順 (ギ酸処理) p6

免疫組織染色手順 (ギ酸処理後、マイクロウェーブまたはオートクレーブ処理) p7

抗原ペプチドによる抗体吸収試験 p8

ウエスタン・ブロッティング (Western Blotting) p9

免疫沈降法 (Immuno-precipitation) p10

免疫組織染色手順 (前処理なし)

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. TBS-T にて軽くリンス洗浄
6. 正常血清ブロッキング処理 : 室温 30 分
Goat Whole Serum を 5 % に希釈して使用 (※2 次抗体の動物血清を使用)
7. TBS-T にて軽くリンス洗浄
8. 1 次抗体反応 : 4 °C 一昼夜インキュベーション
※染色試薬によっても反応性が異なりますので、使用濃度は製品説明書の表示を参考に各施設でご検討ください
9. TBS-T 洗浄 5 分×3 回
10. 2 次抗体反応 : 室温 30 分
例)
1 次抗体がウサギポリクローナル抗体の場合 :
Anti-Rabbit IgG Goat IgG-Biotin (濃度 : 製品説明書に従う)
1 次抗体がマウスモノクローナル抗体の場合 :
Anti-Mouse IgG Goat IgG-Biotin (濃度 : 製品説明書に従う)
11. TBS-T 洗浄 5 分×3 回
12. ABC 試薬の反応 : 室温 30 分 (Vectastain ABC Kit, PEROXIDASE STANDARD PK-4000)
13. TBS-T 洗浄 5 分×3 回
14. 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)
15. 流水洗浄 3 分
16. 核染色 (ヘマトキシリン)
17. 色出し 5 分
18. 脱水
19. 透徹
20. 封入

081001/KK
120625/KK
130108/MY

免疫組織染色手順 (マイクロウェーブ前処理)

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. マイクロウェーブ処理* 90 °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 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
※染色試薬によっても反応性が異なりますので、使用濃度は製品説明書の表示を参考に各施設でご検討ください
12. TBS-T 洗浄 5 分×3 回
13. 2 次抗体反応：室温 30 分
例)
1 次抗体がウサギポリクローナル抗体の場合：
Anti-Rabbit IgG Goat IgG-Biotin (濃度：製品説明書に従う)
1 次抗体がマウスモノクローナル抗体の場合：
Anti-Mouse IgG Goat IgG-Biotin (濃度：製品説明書に従う)
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

*** 家庭用電子レンジを使用する場合**

- ① 500 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る
 - ② 家庭用電子レンジ内で沸騰後、さらに 10 分照射する(500 W の場合)
- 注：クエン酸緩衝液が蒸散してしまわないように、軽くラップをかけてください

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

081001/KK
110215/KK
130108/KK

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 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
※染色試薬によっても反応性が異なりますので、使用濃度は製品説明書の表示を参考に各施設でご検討ください
12. TBS-T 洗浄 5 分×3 回
13. 2 次抗体反応: 室温 30 分
例)
1 次抗体がウサギポリクローナル抗体の場合:
Anti-Rabbit IgG Goat IgG-Biotin (濃度: 製品説明書に従う)
1 次抗体がマウスモノクローナル抗体の場合:
Anti-Mouse IgG Goat IgG-Biotin (濃度: 製品説明書に従う)
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

081001/KK
130108/MY

免疫組織染色手順 (トリプシン前処理)

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. TBS-T にて軽くリンス洗浄
6. 0.1 % トリプシン処理 室温 30 分
※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、各施設での条件設定をお勧め致します。
7. TBS-T にて軽くリンス洗浄
8. 正常血清ブロッキング処理 : 室温 30 分
Goat whole serum を 5 % に希釈して使用 (※2 次抗体の動物血清を使用)
9. TBS-T にて軽くリンス洗浄
10. 1 次抗体反応 : 4 °C 一昼夜インキュベーション
※染色試薬によっても反応性が異なりますので、使用濃度は製品説明書の表示を参考に各施設でご検討ください
11. TBS-T 洗浄 5 分×3 回
12. 2 次抗体反応 : 室温 30 分
例)
1 次抗体がウサギポリクローナル抗体の場合 :
Anti-Rabbit IgG Goat IgG-Biotin (濃度 : 製品説明書に従う)
1 次抗体がマウスモノクローナル抗体の場合 :
Anti-Mouse IgG Goat IgG-Biotin (濃度 : 製品説明書に従う)
13. TBS-T 洗浄 5 分×3 回
14. ABC 試薬の反応 : 室温 30 分 (Vectastain ABC Kit, PEROXIDASE STANDARD PK-4000)
15. TBS-T 洗浄 5 分×3 回
16. 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)
17. 流水洗浄 3 分
18. 核染色 (ヘマトキシリン)
19. 色出し 5 分
20. 脱水
21. 透徹
22. 封入

081001/KK
130108/MY

免疫組織染色手順 (ギ酸処理)

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. ギ酸処理 濃度は 99 %以上を使用 (70 %以上なら可能) : 室温 5 分
6. 流水洗浄 3 分
7. TBS-T にて軽くリンス洗浄
8. 正常血清ブロッキング処理 : 室温 30 分
Goat Whole Serum を 5 %に希釈して使用 (※2 次抗体の動物血清を使用)
9. TBS-T にて軽くリンス洗浄
10. 1 次抗体反応 : 4 °C 一昼夜インキュベーション
※染色試薬によっても反応性が異なりますので、使用濃度は製品説明書の表示を参考に各施設でご検討ください
11. TBS-T 洗浄 5 分×3 回
12. 2 次抗体反応 : 室温 30 分
例)
1 次抗体がウサギポリクローナル抗体の場合 :
Anti-Rabbit IgG Goat IgG-Biotin (濃度 : 製品説明書に従う)
1 次抗体がマウスモノクローナル抗体の場合 :
Anti-Mouse IgG Goat IgG-Biotin (濃度 : 製品説明書に従う)
13. TBS-T 洗浄 5 分×3 回
14. ABC 試薬の反応 : 室温 30 分 (Vectastain ABC Kit, PEROXIDASE STANDARD PK-4000)
15. TBS-T 洗浄 5 分×3 回
16. 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)
17. 流水洗浄 3 分
18. 核染色 (ヘマトキシリン)
19. 色出し 5 分
20. 脱水
21. 透徹
22. 封入

081001/KK
120420/KK
130108/MY
170925/KI

免疫組織染色手順 (ギ酸処理後、マイクロウェーブまたはオートクレーブ処理)

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. ギ酸処理 濃度は 99 %以上を使用 (70 %以上なら可能): 室温 5 分
6. 流水洗浄 3 分
7. マイクロウェーブ*
または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)
8. 放置冷却
9. 流水洗浄 3 分
10. TBS-T にて軽くリンス洗浄
11. 正常血清ブロッキング処理: 室温 30 分
Goat whole serum を 5 %に希釈して使用 (※2 次抗体の動物血清を使用)
12. TBS-T にて軽くリンス洗浄
13. 1 次抗体反応: 4 °C 一昼夜インキュベーション
※染色試薬によっても反応性が異なりますので、使用濃度は製品説明書の表示を参考に各施設でご検討ください
14. TBS-T 洗浄 5 分×3 回
15. 2 次抗体反応: 室温 30 分
例)
1 次抗体がウサギポリクローナル抗体の場合:
Anti-Rabbit IgG Goat IgG-Biotin (濃度: 製品説明書に従う)
1 次抗体がマウスモノクローナル抗体の場合:
Anti-Mouse IgG Goat IgG-Biotin (濃度: 製品説明書に従う)
16. TBS-T 洗浄 5 分×3 回
17. ABC 試薬の反応: 室温 30 分 (Vectastain ABC Kit, PEROXIDASE STANDARD PK-4000)
18. TBS-T 洗浄 5 分×3 回
19. 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)
20. 流水洗浄 3 分
21. 核染色 (ヘマトキシリン)
22. 色出し 5 分
23. 脱水
24. 透徹
25. 封入

*** 家庭用電子レンジを使用する場合**

- ① 500 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る
- ② 家庭用電子レンジ内で沸騰後、さらに 10 分照射する(500 W の場合)
注: クエン酸緩衝液が蒸散してしまわないように、軽くラップをかけてください

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

081001/KK
130108/MY
170925/KI

抗原ペプチドによる抗体吸収試験

ペプチドによる吸収法

- (1) 抗体希釈バッファー (1 % BSA in PBS) へ抗体溶液とペプチド溶液を、
抗体 : ペプチド = 1 mol : 20 mol になるように加えます。
ペプチド溶液の代わりに精製水を加えたもの(ペプチド(-))をコントロールとします。
- (2) 4 °Cで一晩転倒混和し十分に反応させます。この時ペプチド(-) も同時におこないます。
- (3) 上記の吸収処理を終えたものを WB または免疫染色の一次抗体として使用します。

【計算例】

弊社では抗体の分子量を約150,000として計算しています

抗体 Code No.18415 Anti-Human VEGF-C (103) Rabbit IgG の場合

吸収用ペプチド Code No.18417 Human VEGF-C (103) Antigen Peptides 分子量 1,827

重量比率は

抗体 : ペプチド = 1 mol : 20 mol = 150,000 : 1,827 × 20 = 1g : 0.24 g となります。

仮に

抗体溶液濃度 : 100 µg/mL

ペプチド溶液濃度 : 100 µg/mL

を用いて、抗体終濃度 5 µg/mL の溶液を 1 mL 調製する場合は

	抗体溶液	ペプチド溶液	1 % BSA in PBS
ペプチド(+)	50 µL	12 µL	938 µL
ペプチド(-)	50 µL	—	950 µL

の混合比率となります

↓

4 °C、一晩、転倒混和

↓

WB または免疫染色に使用します。

081001/KK
110622/KK

ウエスタン・ブロッティング (Western Blotting)**試薬 :**

- ・ **2x Sample Buffer**
125mM Tris-HCl (pH6.8), 4% SDS, 20% Glycerol, 10% 2-Mercaptoethanol, 0.02% BPB
- ・ **HRP 標識 2 次抗体**
Anti-Rabbit IgG (H+L) Goat IgG Fab' HRP (IBL, #17502) あるいは
Anti-Mouse IgG (H+L) Goat IgG Fab' HRP (IBL, #17601)
- ・ **ブロッキング溶液**
3 % milk, 1 % BSA, 0.05 % NaN₃/PBS
- ・ **洗浄液**
0.05% Tween20/PBS
- ・ **ECL western detection kit**
(GE healthcare, #RPN2106)

方法 :

1. PAGE :
調製済みサンプル 10 - 20 μ L を 7-12 %濃度のアクリルアミドゲルにアプライし、電気泳動
2. ブロッティング : 泳動操作によりナイロンメンブランなどの膜に転写
3. 転写膜のブロッキング : ブロッキング溶液 37°C で 2 時間
4. 洗浄液で洗浄 : 5 分、3 回
5. 1 次抗体の反応 (指定の濃度で) : 37°C で 2 時間 あるいは 4°C で一昼夜
6. 洗浄液で洗浄 : 5 分、3 回
7. 2 次抗体の反応 (製品指定の濃度で) : 37°C で 1 時間
8. 洗浄液で洗浄 : 5 分、3 回
9. ECL による検出 : 浸透時間 : 1 分間、感光時間は 1 分間~1 時間 (サンプルによる)

サンプル調製例

- 1) 細胞 Lysate
 - ① 培養細胞を PBS で洗浄、必要であればトリプシン処理
 - ② トリプシン停止後、PBS で洗浄 (細胞数を計測しておく)
 - ③ 2x Sample Buffer に懸濁(1 - 5 x 10⁵ cells/10 μ L)
 - ④ ソニケーション
 - ⑤ 沸騰処理 : 3 分間
 - ⑥ 遠心分離 : 14000rpm, 4°C で 3 分間
 - ⑦ 上清を使用する
- 2) 細胞培養上清
そのまま使用する

081001/KK
130108/MY

免疫沈降法 (Immuno-precipitation)

試薬

1. **TNE 緩衝液 :**
10 mM Tris-HCl (pH7.8), 1% NP-40, 0.15 M NaCl, 1 mM EDTA, 10 µg/mL aprotinin
2. **Protein G-Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare #17-0618-01) :**
TNE 緩衝液で洗浄しておく

方法

1. 調製したサンプル(抽出物上清など)に Protein G-Sepharose を加える
: 50 µL/サンプル 1 mL
2. 転倒混和 : 4 °C 一昼夜
3. 遠心分離 : 4 °C 14,000 rpm 20 分
4. 上清に抗体を加える : 約 3 µg/サンプル 100 - 400 µL
5. 転倒混和 : 4 °C 1 時間
6. Protein G-Sepharose を加える : 20 µL/サンプル 100 - 400 µL
7. 転倒混和 : 4 °C 1 時間
8. TNE 緩衝液で洗浄 : 4 °C 5,000 rpm 1 分 X 5 回
9. 沈殿物 (immunoprecipitate)
10. WB などで確認する

081001/KK
130108/MY