

製品コード MK200 ～ MK205

研究用

TaKaRa

TaKaRa POD Conjugate For Mouse Tissue/For Tissue

説明書

TaKaRa POD Conjugate は、パラフィン包埋切片用の免疫組織化学染色試薬です。本製品の主な構成成分は、Fab' にフラグメント化した二次抗体とペルオキシダーゼ（酵素）をアミノ酸ポリマーに結合した標識ポリマーで、安定化タンパク質と抗菌剤を含む MOPS (3-(*N*-Morpholino)propanesulfonic acid) 緩衝液 (pH6.5) でそのまま使用可能な濃度に調製されています。ストレプトアビジン・ビオチン法と比較して、簡便な操作性で高感度、低バックグラウンドの明瞭な染色結果を得ることができます。本製品はマウス組織専用 (For Mouse Tissue) と組織一般用 (For Tissue) に分かれています。マウス組織専用には一次抗体の免疫動物種により Anti Mouse、Anti Rat、Anti Rabbit の 3 種類、組織一般用には Anti Mouse、Anti Rabbit、Anti Goat の 3 種類があります。この中でも TaKaRa POD Conjugate Set Anti Mouse, For Mouse Tissue (製品コード MK200) は、ブロッキング試薬 A、B と TaKaRa POD Conjugate Anti Mouse, For Mouse Tissue で構成された、マウス組織にマウス一次抗体が使用できる特長のある製品です。For Tissue シリーズは基本性能において種横断的に使用可能です。組織や一次抗体ごとに条件検討を行ってご利用ください。

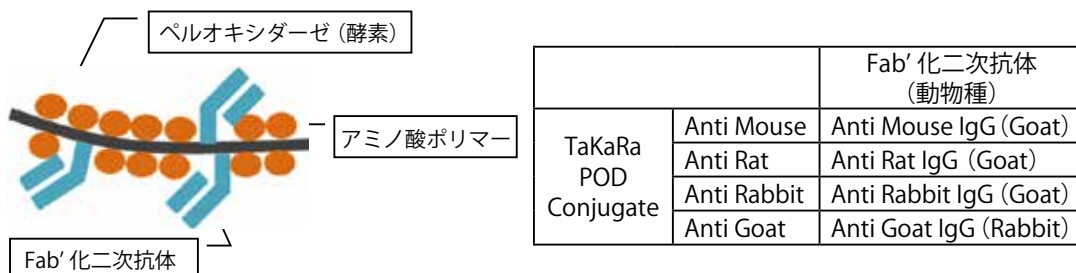
TaKaRa POD Conjugate の特長

- ・ 吸収処理により、内因性グロブリン (Ig) とは反応しない。
- ・ アビジン・ビオチン系を利用しないので、内因性ビオチンの影響を受けない。
- ・ ストレプトアビジン・ビオチン (SAB) 法で行うブロッキング、二次抗体と酵素試薬の反応を省略できる。*

* : TaKaRa POD Conjugate Set Anti Mouse, For Mouse Tissue は添付の構成試薬による内因性 Mouse Ig のブロッキング操作が必要です

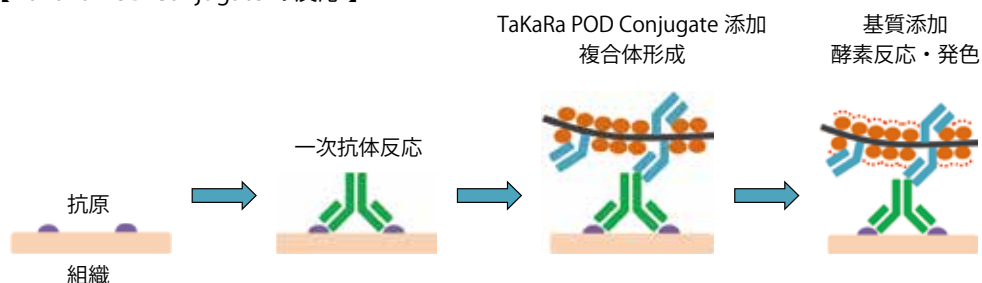
I. 測定原理

【TaKaRa POD Conjugate の構造】



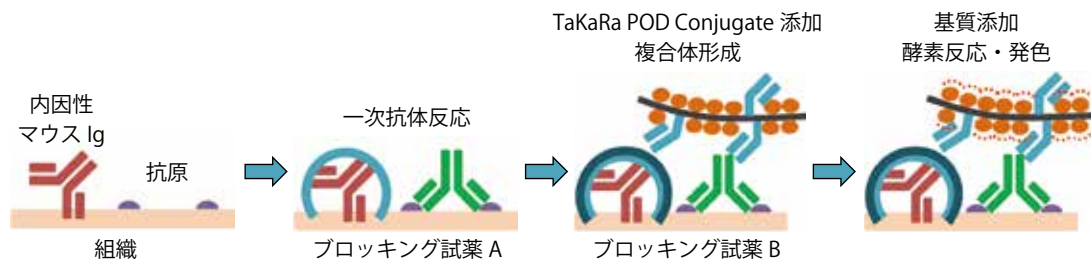
TaKaRa POD Conjugate は、Fab' にフラグメント化した二次抗体とペルオキシダーゼ（酵素）をアミノ酸ポリマーに結合した標識ポリマーです。

【TaKaRa POD Conjugate の反応】



組織切片上の抗原に一次抗体を反応させた後、TaKaRa POD Conjugate を反応させると標識ポリマーが抗原・一次抗体と複合体を形成します。その複合体の酵素活性を利用して、基質を発色させることにより目的の抗原部位を染色します。

【 TaKaRa POD Conjugate Set Anti Mouse, For Mouse Tissue の反応 】



TaKaRa POD Conjugate Set Anti Mouse, For Mouse Tissue は、マウスの組織にマウス一次抗体を用いる場合に使用可能な製品です。一次抗体反応前後にブロッキング試薬を用いることで、内因性グロブリン (Ig) との反応を阻害してバックグラウンド染色を抑制し、目的抗原のみを染めることができます。

II. 製品一覧

製品コード	製品名	容量 (標準使用時)	対象組織	一次抗体 免疫動物種	
MK200	TaKaRa POD Conjugate Set Anti Mouse, For Mouse Tissue 内容 ・ Blocking Reagent A ・ Blocking Reagent B ・ TaKaRa POD Conjugate Anti Mouse, For Mouse Tissue	1 セット 60 反応 6 ml 6 ml 6 ml	マウス	マウス	
	MK201	TaKaRa POD Conjugate Anti Rat, For Mouse Tissue		6 ml 60 反応	ラット
	MK202	TaKaRa POD Conjugate Anti Rabbit, For Mouse Tissue		6 ml 60 反応	ウサギ モルモット
MK203	TaKaRa POD Conjugate Anti Goat, For Tissue	6 ml 60 反応	一般	ヤギ	
MK204	TaKaRa POD Conjugate Anti Mouse, For Tissue	6 ml 60 反応		マウス	
MK205	TaKaRa POD Conjugate Anti Rabbit, For Tissue	6 ml 60 反応		ウサギ モルモット	

本製品はパラフィン包埋切片の免疫組織化学染色の標識二次抗体として使用できる製品で、短時間に特異的に目的抗原を染色できるように調製されています。いずれの試薬も原液でご使用ください。

対象組織サイズ 1 cm × 1 cm に対して、1 回あたり 2 滴の使用が標準です。

ドロッパーボトル 1 滴あたり 40 ~ 45 μ l です。

【 TaKaRa POD Conjugate Set Anti Mouse, For Mouse Tissue (製品コード MK200) 】

本製品は、マウス組織に対して、自己抗体となるマウス由来の一次抗体（ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体）を使用する場合において、一次抗体反応の前と後にブロッキング試薬 A と B (Blocking Reagent A、Blocking Reagent B) を用いることで、内因性マウス IgG (Mouse Ig) との反応を阻害してバックグラウンド染色を抑制し、目的抗原のみを染めることができるように設計されています。

● 形状・成分

- TaKaRa POD Conjugate Anti Mouse, For Mouse Tissue (ドロップパーボトル入り溶液) 6 ml
Goat Anti Mouse Ig-Fab - Peroxidase Conjugate
MOPS (3-(*N*-Morpholino)propanesulfonic acid) buffer (pH6.5)
Bovine Serum Albumin および防腐剤含有
- Blocking Reagent A (ドロップパーボトル入り溶液) 6 ml
0.1% アジ化ナトリウム含有タンパク質溶液
- Blocking Reagent B (ドロップパーボトル入り溶液) 6 ml
0.1% アジ化ナトリウム含有

【 TaKaRa POD Conjugate Anti Rat, For Mouse Tissue (製品コード MK201) 】

本製品は、マウス組織に対して、一次抗体がラット由来の場合に使用します。

● 形状・成分

- TaKaRa POD Conjugate Anti Rat, For Mouse Tissue (ドロップパーボトル入り溶液) 6 ml
Goat Anti Rat Ig-Fab - Peroxidase Conjugate
MOPS (3-(*N*-Morpholino)propanesulfonic acid) buffer (pH6.5)
Bovine Serum Albumin および防腐剤含有

【 TaKaRa POD Conjugate Anti Rabbit, For Mouse Tissue (製品コード MK202) 】

本製品は、マウス組織に対して、一次抗体がウサギ由来の場合に使用します。

● 形状・成分

- TaKaRa POD Conjugate Anti Rabbit, For Mouse Tissue (ドロップパーボトル入り溶液) 6 ml
Goat Anti Rabbit Ig-Fab - Peroxidase Conjugate
MOPS (3-(*N*-Morpholino)propanesulfonic acid) buffer (pH6.5)
Bovine Serum Albumin および防腐剤含有

【 TaKaRa POD Conjugate Anti Goat, For Tissue (製品コード MK203) 】

本製品は、一般の動物組織に対して、一次抗体がヤギ由来の場合に使用します。

● 形状・成分

- TaKaRa POD Conjugate Anti Goat, For Tissue (ドロップパーボトル入り溶液) 6 ml
Rabbit Anti Goat Ig-Fab - Peroxidase Conjugate
MOPS (3-(*N*-Morpholino)propanesulfonic acid) buffer (pH6.5)
Bovine Serum Albumin および防腐剤含有

【 TaKaRa POD Conjugate Anti Mouse, For Tissue (製品コード MK204) 】

本製品は、一般の動物組織に対して、一次抗体がマウス由来の場合に使用します。

●形状・成分

- ・ TaKaRa POD Conjugate Anti Mouse, For Tissue (ドロPPERボトル入り溶液) 6 ml
Goat Anti Mouse Ig-Fab - Peroxidase Conjugate
MOPS (3-(N-Morpholino)propanesulfonic acid) buffer (pH6.5)
Bovine Serum Albumin および防腐剤含有

【 TaKaRa POD Conjugate Anti Rabbit, For Tissue (製品コード MK205) 】

本製品は、一般の動物組織に対して、一次抗体がウサギ由来の場合に使用します。

●形状・成分

- ・ TaKaRa POD Conjugate Anti Rabbit, For Tissue (ドロPPERボトル入り溶液) 6 ml
Goat Anti Rabbit Ig-Fab - Peroxidase Conjugate
MOPS (3-(N-Morpholino)propanesulfonic acid) buffer (pH6.5)
Bovine Serum Albumin および防腐剤含有

III. 保存 アルミパウチ遮光下にて 4℃保存

IV. 使用目的

本製品は、パラフィン包埋切片用免疫組織化学染色用試薬です。
本製品で凍結切片を染色することも可能ですが、染色法の検討(最適化)が別途必要です。
(VII. 応用の 1. 凍結切片を用いた免疫染色を参照)

※本製品は研究用です。診断目的には使用できません。

V. 使用方法

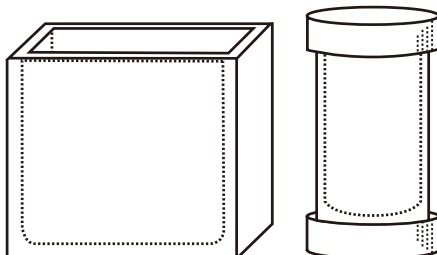
【免疫染色に必要な器具や試薬(主なもの)】

[器具]

- | | | |
|----------|---------|------------|
| ・スライドガラス | ・乾燥機 | ・タイマー |
| ・染色用容器*1 | ・洗浄用容器 | ・スライドスタンド |
| ・湿潤箱 | ・カバーガラス | ・ティッシュペーパー |
| ・光学顕微鏡 | | |

* 1：染色用容器

ガラス製、プラスチック製等の容器で、透明で溶媒耐性のものを使用する。



[試薬]

- ・キシレン
- ・95% エタノール
- ・100% エタノール
- ・PBS (洗浄用)
- ・3% 過酸化水素含メタノール*2
- ・一次抗体
- ・陰性コントロール (一次抗体の免疫動物種の正常血清)
- ・基質溶液 (DAB 溶液または AEC 溶液)
TaKaRa DAB Substrate (製品コード MK210) など
- ・対比染色試薬 (ヘマトキシリン、メチルグリーン等)
- ・封入剤
- ・組織切片用接着剤 (必要に応じて)
- ・抗原賦活化液
- ・精製水

* 2 : 3% 過酸化水素含メタノール
30% 過酸化水素水をメタノールで 10 倍希釈する (用時調製)。

1. 検体の準備

パラフィン包埋切片

切片を 3 ~ 6 μm に薄切し、スライドに付着させる。賦活化処理を行う場合は、剥離防止に 0.02% poly-L-lysine あるいはシラン等の表面処理がなされたスライドの使用を推奨する。

検体標本スライド

検体標本スライドは 1 検体に対し 1 枚の試薬対照スライドを準備する。

- ・検体標本スライド
目的の一次抗体を用いて染色操作を行う。
- ・試薬対照スライド
一次抗体のかわりに陰性コントロール (一次抗体免疫動物の正常血清等) を使用して染色操作を行う。

検体対照スライド

検体対照スライドを用意し、染色操作から検鏡までの全工程を検体標本スライド及び試薬対照スライドと並行して行う。

- ・陽性コントロールスライド
検体標本と同様の方法で作製された、あらかじめ目的抗原が存在することを確認している組織切片スライド
- ・陰性コントロールスライド
検体標本と同様の方法で作製された、あらかじめ目的抗原が存在しないことを確認している組織切片スライド

【 注意 】

- ・抗原は熱に弱いので、組織を包埋する際にパラフィンの温度を 58°C 以上にしないでください。
- ・ステロイドやその他小さな分子は有機溶媒に極めて溶けやすく、抗原の損失を防ぐには固定剤の選択に注意する必要があります。

2. 試薬の調製

本製品 (製品コード MK200 ~ MK205) はいずれの試薬も即時使用可能な濃度に調製されているので、原液でそのまま使用してください。

3. 操作法

操作中の常温とは 15 ～ 25℃とする。温度の指定がない場合は常温で操作を行う。

TaKaRa POD Conjugate を用いた免疫組織化学染色手順

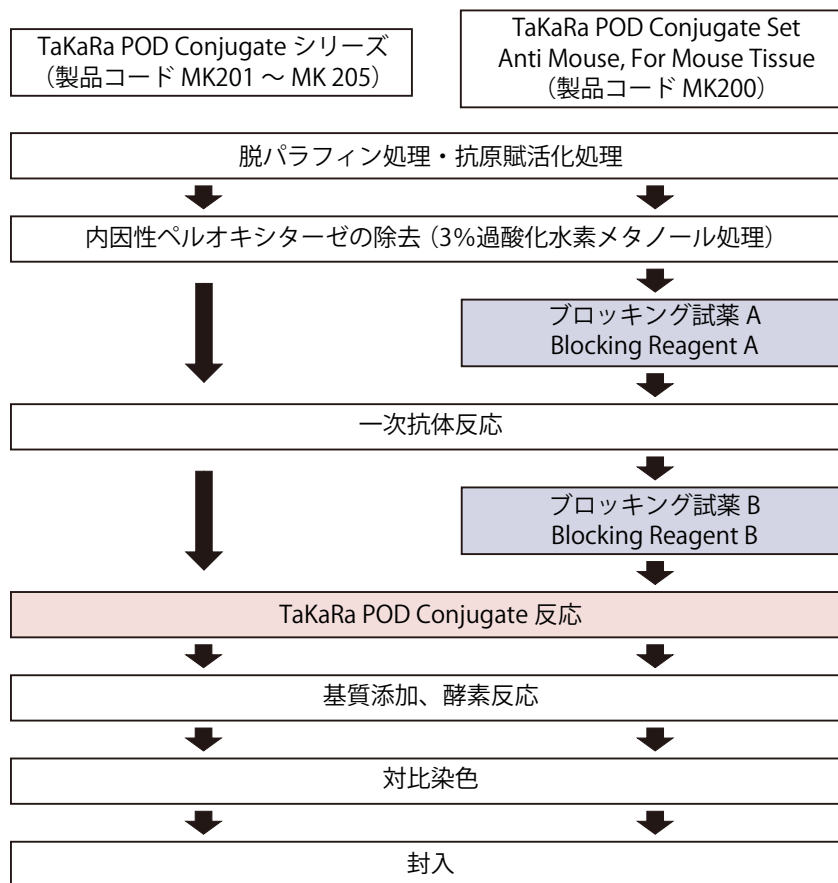


図 1. 免疫染色フローチャート

A. 脱パラフィン

表 1. 脱パラフィン工程

1	キシレン 1	3分
2	キシレン 2	3分
3	キシレン 3	3分
4	100% (無水) エタノール 1	3分
5	100% (無水) エタノール 2	3分
6	95%エタノール 1	3分
7	95%エタノール 2	3分
8	PBS 洗浄	3分 (3回)

- ・キシレンを3つの染色用容器に準備する。
- ・100% (無水) エタノールを2つの染色用容器に準備する。
- ・95% エタノールを2つの染色用容器に準備する。
- ・PBSを染色用容器に準備する。
- ・各試薬に組織切片及びパラフィンの領域が十分浸漬する量が確認する。

※有機溶剤はドラフト等の排気設備内で適切に使用すること。

(1) キシレン処理

- 1) スライドを第1のキシレンに3分間浸漬する。
- 2) 余分な液を切り、第2のキシレンに3分間浸漬する。
- 3) 余分な液を切り、第3のキシレンに3分間浸漬する。続けて、エタノール処理を行う。

(2) エタノール処理

- 1) スライドを第1の100% (無水) エタノールに3分間浸漬する。
- 2) 余分な液を切り、第2の100% (無水) エタノールに3分間浸漬する。
- 3) 余分な液を切り、第1の95% エタノールに3分間浸漬する。
- 4) 余分な液を切り、第2の95% エタノールに3分間浸漬する。

(3) 洗浄

- 1) 余分な液を切り、PBSに3分間浸漬し洗浄する。
- 2) PBSを交換して、3分間浸漬し洗浄する。
- 3) 同様にもう一度洗浄する。(計3回洗浄)

※続けて内因性ペルオキシダーゼの処理を行う場合は省略しても良い。

脱パラフィンのポイント

- ・キシレン処理の直前にスライドを40～50℃の恒温槽やブロックインキュベーター等で10分程度温めておくとパラフィンが溶解しやすい。
- ・液の汚れや劣化が認められたらキシレン、エタノールを交換する。使用頻度によって定期的に交換することが望ましい。

B. 抗原賦活化処理

抗原賦活化処理やタンパク質分解酵素処理は必要に応じて行う。一次抗体の至適条件がある場合はそれに従う。一般的な手法については、VI. 参考情報の2. 抗原賦活化処理を参照。

C. 免疫染色

- ・染色工程で切片を乾燥させてはいけない。湿潤箱、カバースリッパ等を利用して乾燥を防止する。
- ・試薬は使用前に常温に戻しておく。

(1) 内因性ペルオキシダーゼの除去 (3% 過酸化水素含メタノールによる処理)

3% 過酸化水素加メタノールを準備する。(用時調製)

- 1) 切片の周りの余分な水分を取り除く。
- 2) 3% 過酸化水素含メタノールに切片を完全に浸し、常温 (15 ~ 25°C) で 10 ~ 15 分間反応させる。
- 3) 余分な液を切り、PBS に 3 分間浸漬し洗浄する。
- 4) PBS を交換して、3 分間浸漬し洗浄する。
- 5) 同様にもう一度洗浄する。(計 3 回洗浄)

(2) ブロッキング処理 A

TaKaRa POD Conjugate Anti Mouse Set, For Mouse Tissue (製品コード MK200)のみ実施

- 1) 切片の周りの余分な水分を取り除く。
- 2) 切片が完全に覆われるように、ブロッキング試薬 A (Blocking Reagent A) をのせる。常温で 60 分間反応させる。カバースリッパ等用いて乾燥を防ぐ。
- 3) PBS に 3 分間浸漬し洗浄する。
- 4) PBS を交換して、3 分間浸漬し洗浄する。
- 5) 同様にもう一度洗浄する。(計 3 回洗浄)

(3) 一次抗体反応

- 1) 切片の周りの余分な水分を取り除く。
- 2) 抗体濃度及び反応温度、反応時間は一次抗体の至適反応条件に従う。
検体標本スライドの切片が完全に覆われるように、一次抗体をのせる。
陽性コントロールスライド、陰性コントロールスライドにも同じ抗体をのせる。
試薬対照スライドには陰性コントロール (一次抗体免疫動物の正常血清等) をのせる。
(標準的には常温 1 ~ 2 時間、もしくは 4°C 一晩反応させる。)
- 3) PBS に 3 分間浸漬し洗浄する。
- 4) PBS を交換して、3 分間浸漬し洗浄する。
- 5) 同様にもう一度洗浄する。(計 3 回洗浄)

(4) ブロッキング処理 B

TaKaRa POD Conjugate Anti Mouse Set, For Mouse Tissue (製品コード MK200)のみ実施

- 1) 切片の周りの余分な水分を取り除く。
- 2) 切片が完全に覆われるように、ブロッキング試薬 B (Blocking Reagent B) をのせる。常温で 10 分間反応させる。
- 3) PBS に 3 分間浸漬し洗浄する。
- 4) PBS を交換して、3 分間浸漬し洗浄する。
- 5) 同様にもう一度洗浄する。(計 3 回洗浄)

(5) TaKaRa POD Conjugate による反応

組織の動物種と一次抗体の免疫動物種に対応した TaKaRa POD Conjugate を選択する。

- 1) 切片の周りの余分な水分を取り除く。
- 2) 切片が完全に覆われるように、TaKaRa POD Conjugate をのせる。(対象組織サイズ 1 cm × 1 cm に対して、通常 2 滴使用する。) 常温で 30 分間反応させる。*
- 3) PBS に 3 分間浸漬し洗浄する。
- 4) PBS を交換して、3 分間浸漬し洗浄する。
- 5) 同様にもう一度洗浄する。(計 3 回洗浄)

* : バックグラウンドが高くなる場合は、反応時間等の検討が必要です。

(6) 基質溶液による反応

基質を適宜選択する。(VI. 参考情報の 1. 基質・封入剤・対比染色の選択参照)

- 1) 切片の周りの余分な水分を取り除く。
- 2) 切片が完全に覆われるように、基質溶液 (DAB または AEC) をのせる。常温で 5 ~ 20 分間反応させる。
- 3) 精製水ですすぐ。

D. 対比染色

対比染色試薬を適宜選択する。(VI. 参考情報の 1. 基質・封入剤・対比染色の選択参照)

- (1) 対比染色試薬にスライドを浸漬する。対比染色試薬の希釈や染色時間を調整し、基質の発色に対して適度な染色を行う。
- (2) 流水 (水道水) で 10 分程度洗浄する。最後は精製水に置換して不純物をすすぐ。

E. 封入

- ・ DAB 発色は水洗後、脱水、キシレンによる透徹を行い、非水溶性封入剤で封入する。
- ・ AEC 発色は水洗後、水溶性封入剤で封入する。

F. 脱水・透徹 (非水溶性封入剤使用時のみ)

表 2. 脱水・透徹の工程

1	75%エタノール	3分	脱水
2	95%エタノール	3分	
3	100% (無水) エタノール 1	3分	
4	100% (無水) エタノール 2	3分	
5	キシレン 1	3分	透徹
6	キシレン 2	3分	
7	封入 非水溶性封入剤		

脱水・透徹のポイント

- ・ 無水エタノールで完全に脱水しなければ、透徹で透明性を得られない。透明にならない場合は液を交換して、脱水からやり直す。
- ・ アルコール濃度の低下や汚れが認められたら、新しい試薬を用意する。
- ・ スライドの液はよくきること。
- ・ 脱水、透徹の操作途中に標本を乾燥させない。

VI. 参考情報

1. 基質・封入剤・対比染色の選択

酵素	基質	発色	封入剤	特長
Peroxidase	DAB (3,3-Diaminobenzidine) ※ TaKaRa DAB Substrate (製品コード MK210) の使用を推奨	茶	非水溶性 封入剤	脱水・透徹操作が必要 ○ スライドの半永久保存が可能 ● DAB は用時調製を推奨 ● 発がん性の配慮 対比染色：ヘマトキシリン (青) or メチルグリーン (緑)
	AEC (3-Amino-9-ethylcorbazol)	赤	水溶性 封入剤	● スライドの長期保存に向かない。 ○ AEC は溶液中で安定、長期保存可 対比染色：ヘマトキシリン (青)

2. 抗原賦活化処理

一次抗体の抗原賦活化法についての情報がない場合、賦活化が不要であるかまたは賦活化方法の検討が必要です。一般的な抗原賦活化法として、熱による抗原賦活化処理とタンパク質分解酵素処理が広く用いられています。

A. 熱による抗原賦活化処理

熱による賦活化法は主に以下のような方法と緩衝液の組み合わせがある。

方法：マイクロウェーブ法 オートクレーブ法 温浴法

緩衝液：クエン酸緩衝液 pH6.0 Tris・EDTA 緩衝液 pH9.0
--

< 緩衝液の調製 >

(1) 10 mM クエン酸ナトリウム緩衝液 pH6.0 の調製法

精製水に A 液、B 液を以下の割合で加えよく混合する。(用時調製)

A 液	9 ml
B 液	41 ml
精製水	450 ml
Total	500 ml

A 液：0.1 M クエン酸水溶液 (常温保存可)

クエン酸一水和物 ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) 2.1 g/ 精製水 100 ml

B 液：0.1 M クエン酸ナトリウム水溶液 (常温保存可)

クエン酸三ナトリウム二水和物 ($C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$) 14.7 g/ 精製水 500 ml

(2) Tris・EDTA 緩衝液 (TE) pH9.0 の調製法

Tris	1.21 g
EDTA・2Na	0.37 g
精製水で 1 L にフィルアップする。	

よく混和し pH9.0 に調製する。必要に応じて Tween 20 を 0.1% 以下で添加し良く混和する。室温で 3 カ月、4°C で長期保存可能。

< 方法 >

※以下の操作では緩衝液を高温に保つので、火傷しないよう十分注意する。

(1) 賦活化処理 MW (マイクロウェーブ) 法 (500 W)

- 1) 緩衝液を耐熱性バットに入れて MW 照射し、あらかじめ緩衝液のみを沸騰させる。精製水もビーカー等に入れ一緒に沸騰させる。(緩衝液 300 ml で約 5 分照射)
- 2) 緩衝液に切片を浸し、緩衝液の水面の位置に印を付ける。沸騰により緩衝液が蒸発して、切片が乾かないように気をつけながら MW を 5 分間照射する。緩衝液が減少したら一緒に沸騰させている精製水を緩衝液のバットにつけた印 (もとの水面) の位置まで加える。
- 3) 同様に MW 照射を 1～2 回繰り返す。(計 10～15 分照射)
- 4) 切片を緩衝液につけたままバットごと回収し、常温で 20 分以上放置しゆっくりと熱を冷ます。
- 5) PBS で洗浄する。(常温で 3 分、3 回)

(2) 賦活化処理 AC (オートクレーブ) 法

- 1) 調製した緩衝液を耐熱性バットに入れ、切片を浸す。
- 2) 120℃、20 分間のオートクレーブ処理をする。
- 3) 圧力が十分下がった後バットを取り出し、切片を緩衝液に付けたまま、常温で 20 分以上放置しゆっくりと熱を冷ます。
- 4) PBS で洗浄する。(常温で 3 分、3 回)

(3) 賦活化処理 温浴法

- 1) 緩衝液を耐熱性バットに入れ、温浴槽で 95～99℃に温める。緩衝液にスライドを浸漬させ軽く (密閉しない) フタをする。温浴層も温度を保つため軽くフタをする。
- 2) 温度計で緩衝液の温度が 95～99℃に達したことを確認して、40 分間インキュベートする。
- 3) 切片を緩衝液につけたままバットごと回収し、常温で 20 分以上放置しゆっくりと熱を冷ます。
- 4) PBS で洗浄する。(常温で 3 分、3 回)

※電気ポットの 98℃保温機能等でも代用可能。

抗原によって熱の入れ方で賦活化状態が異なる場合があります。また、沸騰させることによって形状が保てず剥離する組織もあるので、上記の方法と緩衝液の組み合わせや加温時間を最適化し、抗原にあった手法を確立することが必要です。

B. タンパク質分解酵素処理

免疫組織化学染色のタンパク質分解処理に使用される主な酵素はプロテアーゼ、ペプシン、トリプシンなどが挙げられる。消化の強度が異なるので、使用する一次抗体に推奨の酵素や条件がある場合は、それに従う。標準的な処理法は以下の通りである。

酵素溶液	温度	消化時間 (目安)
0.05% プロテアーゼ溶液 (混合酵素)	室温	10 分
0.1% Proteinase K 溶液	室温	3 ~ 6 分
0.4% ペプシン溶液	37°C	20 ~ 30 分
0.1% トリプシン溶液	37°C	30 分

- (1) 切片の周りの余分な水分を取り除く。
- (2) 切片が完全に覆われるように、タンパク質分解酵素をのせる。適切な温度と時間で反応させる。
- (3) PBS に 3 分間浸漬し洗浄する。
- (4) PBS を交換して、3 分間浸漬し洗浄する。
- (5) 同様にもう一度洗浄する。(計 3 回洗浄)

VII. 応用

1. 凍結切片を用いた免疫染色

本製品を用いて凍結切片を用いた免疫組織化学染色を行う場合、以下の内容を参考に予備検討を行った上で実施してください。

- ・凍結切片作製方法
組織は固定後、凍結したものを薄切し使用する。未固定で凍結した組織（新鮮凍結組織）では良好な染色結果が得られない場合がある。
- ・組織固定液
一次抗体によって適した固定液は異なるので、固定液の検討を十分に行う。
- ・反応時間
本製品はパラフィン包埋切片用に濃度、反応時間を調整している。凍結切片で実施する場合、そのままのプロトコールではバックグラウンド染色が出る場合がある。
- ・検体の準備
不安定な抗原の場合は、凍結切片標本を用いる。固定液（4% パラホルムアルデヒド等）を用いて組織を 4°C、一晩で固定後、O.C.T. コンパウンドあるいは類似の包埋剤（水溶性）とともに、液体窒素またはドライアイス - アセトン、ドライアイス - エタノールなどで急速凍結する。凍結した切片を 4 ~ 6 μm に薄切し、剥離防止に 0.02% poly-L-lysine あるいはシランなどの表面処理がなされたスライドに付着させ、十分に乾燥させる。乾燥後、凍結用包埋剤を PBS 洗浄で除去する。

※ 必要な試薬や器具や使用方法についてはパラフィン包埋切片の場合をご参照ください。

2. 指定外動物抗体および組織の染色について

マウス、ラット、ウサギ、ヤギ以外を免疫動物とする一次抗体でも交差があれば転用は可能です。その場合、特異的反応の有無等の予備検討が必要になります。自社で評価した一例を以下に示します。

一次抗体 免疫動物種	対象組織	製品コード	製品名
モルモット (Guinea pig)	マウス	MK202	TaKaRa POD Conjugate Anti Rabbit, For Mouse Tissue
	一般	MK205	TaKaRa POD Conjugate Anti Rabbit, For Tissue

また、ミニブタ組織は、組織一般用 (For Tissue) を用いて染色することが可能です。

一次抗体 免疫動物種	対象組織	製品コード	製品名
マウス	ミニブタ (Mini pig)	MK204	TaKaRa POD Conjugate Anti Mouse, For Tissue
ウサギ		MK205	TaKaRa POD Conjugate Anti Rabbit, For Tissue
ヤギ		MK203	TaKaRa POD Conjugate Anti Goat, For Tissue

VIII. 染色結果の判定法

【判定方法】

光学顕微鏡で陽性反応を観察する。染色結果の判定は対照スライドとの比較により行う。

- ・ 陽性コントロールスライド
陽性所見が得られていることを確認する。
- ・ 陰性コントロールスライド
陽性を呈する細胞が認められないことを確認する。
- ・ 試薬対照スライド
陽性を呈する細胞が認められないことを確認する。このスライドの細胞に陽性所見が認められた場合は、非特異的なタンパク質結合などによる非特異的反応が考えられる。

判定法のポイント

- ・ 必ず各検体対照スライドの染色結果と比較して、検体標本スライドの判定を行う。
- ・ パラフィン残存物は、バックグラウンド染色を強める原因となるため、明瞭な染色を得るには、包埋剤を完全に除去することが重要である。
- ・ 一般的にタンパク質や基質反応生成物の非免疫的結合により、偽陽性結果が観察される場合がある。偽陽性結果は赤血球による偽ペルオキシダーゼ反応やチトクロムCによる内因性ペルオキシダーゼ反応によっても起きることがある。
- ・ 検体組織の壊死部分は、抗体が非特異的に結合しやすく、非特異染色の原因となりやすいので、陰性コントロールスライドと比較して十分注意して判定する。
- ・ 顆粒球の一部およびマクロファージなどは細胞膜表面にFcレセプターを有するため、抗体のFc部分と結合する可能性がある。抗体本来の特異的反応部位以外に染色が現れることがあるため、必ず陰性コントロールスライドと比較し、十分注意して判定する。

IX. トラブルシューティング

問題点	考えられる原因	対策
陽性コントロールスライドおよび標本スライドの染色が認められない、あるいは弱い。	染色工程中に切片が乾燥した。	<ul style="list-style-type: none"> 染色工程で湿潤させた組織切片は乾燥させない。湿潤箱等を利用する。
	包埋剤が不適當あるいはパラフィン包埋切片からのパラフィン除去が不完全だった。	<ul style="list-style-type: none"> 適当な包埋剤を選択する。 組織からパラフィンを完全に除去する。 キシレン、エタノール溶液を新しいものに取り換える。
	緩衝液中の微量アジ化ナトリウムがペルオキシダーゼを不活性化し、染色を不可能にした。	<ul style="list-style-type: none"> アジ化ナトリウムを含有しない緩衝液を使用する。 緩衝液を取り換える、または作り直す。
	酵素や抗体反応が不十分だった。	<ul style="list-style-type: none"> 古い基質溶液を取り換える。 各ステップでの水分のふき取りを完全ににする。 抗体との反応時間を十分にする。特に一次抗体のインキュベーション時間は抗体の至適条件で実施する。
陽性コントロールスライドは染色されるが、標本スライドは染色されない。	抗原が固定あるいは包埋過程で変性している、またはマスクされている。	<ul style="list-style-type: none"> 抗原の中には、固定や包埋に敏感なものがあるので、穏やかな固定剤を使用し固定時間を短縮する。 マスクされている場合は、染色前に熱による抗原賦活化処理、またはタンパク質分解酵素処理を検討してみる。
	自己消化により抗原が破壊されている。	<ul style="list-style-type: none"> 採取した組織はすみやかに適切な方法で固定を行う。
	組織に存在する抗原が少ない。	<ul style="list-style-type: none"> インキュベーション時間を長くする。
全ての染色スライドのバックグラウンドが強く染色される。	内因性ペルオキシダーゼが不活性化されていない。	<ul style="list-style-type: none"> 3% 過酸化水素含メタノールによる処理を確実に行う。
	非特異結合成分がある。	<ul style="list-style-type: none"> 一次抗体の添加前に 10% ヤギまたはウサギ正常血清で処理する。
	内因性マウス免疫グロブリンを阻害するための処理が不十分。 (製品コード MK200 の場合)	<ul style="list-style-type: none"> Blocking Reagent A、B の反応時間を守り処理を確実にを行う。 Blocking Reagent A、B を使用前に常温に戻す。
	自己消化の結果、組織液に遊離した抗原が過剰に存在する。	<ul style="list-style-type: none"> 新鮮な組織を包埋する。
	不完全なパラフィン除去	<ul style="list-style-type: none"> キシレン、エタノール溶液を取り換える。
	不十分な抗体の洗浄	<ul style="list-style-type: none"> 抗体洗浄を十分にを行う。
	室内温度が高すぎて、酵素反応が早すぎる。	<ul style="list-style-type: none"> 室温を常温 (15 ~ 25°C) にコントロールする。 反応時間を短縮する。
	染色工程中に切片が乾燥した。	<ul style="list-style-type: none"> 染色工程で湿潤させた組織切片は乾燥させない。湿潤箱等を利用する。
反応中に組織切片がスライドから剥がれてしまう。	熱による抗原賦活化処理や長時間の湿潤状態でスライドガラスから剥がれやすくなる。	<ul style="list-style-type: none"> 0.02% poly-L-Lysine、シランなどの組織切片用接着剤を使用する。 スライドガラスの取扱いに注意する。

X. 関連製品

TaKaRa DAB Substrate (製品コード MK210)
Phosphate Buffered Saline (PBS) Tablets, pH7.4 (製品コード T9181)
Proteinase K (製品コード 9034)

XI. 使用上の注意

- 本製品は使用前に常温 (15 ~ 25℃) に戻してご使用ください。
- 有効期間が過ぎた試薬は使用しないでください。
- 検体は感染性を有する危険性があると想定し、設備及び防具を適切に使用して直接接触することは避け、感染を予防してください。
- 本製品は皮膚・眼部等への直接接触は避けてください。
- 検体組織に接触した器具、試薬および試薬容器等は感染性の危険性があると想定し、オートクレーブによる 120℃、20 分の滅菌処理か、1.0% (v/v) 次亜塩素酸などの消毒液に浸して、一晩処理してください。

XII. 注意

- 本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- 本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先

TaKaRa テクニカルサポートライン

Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995

ホームページアドレス <http://www.takara-bio.co.jp/>

タカラバイオ株式会社