

<免疫組織染色>

**脱パラフィン**

標本作製室にて作業 (MQ に入れたドレーズをもっていく)

キシレン ①4 min, ②30 sec, ③30 sec, ④4 min



アルコール ①4 min, ②30 sec, ③30 sec, ④30 sec, ⑤5 min



MilliQ



Rinse in PBS 5min×3



**抗原賦活化**

10mM クエン酸緩衝液 (pH7.0)

チップ箱にスライドガラスが浸るくらいに液を入れる。このときに、スライドガラスの水  
分をしっかりとキムタオルで拭いてから入れる。



オートクレーブ 121℃、20min



出したら冷めるまで待つ



Rinse in PBS 5min×3



スライドガラスの水気を軽く拭いてから、ポップペンで組織の周りを囲む。  
このとき組織にかぶらないように注意する。組織が乾かないうちに素早く行う。



0.1% Triton-X100 8min

組織全体にかかるくらいの量：200~300  $\mu$ l

乾かないように湿気のある状態のまま保存 (室温、湿潤箱)



Rinse in PBS-T (PBS - 0.1% Tween20) 5min×3



**Blocking**

IHC (peroxidase blocking reagent): 60min

組織全体にかかるくらいの量：200 $\mu$ l くらい

乾かないように湿気のある状態で保持 (室温、湿潤箱で)



1<sup>st</sup>.ab O/N, 4°C (冷蔵庫)

1h, RT など

(抗体の条件による。湿潤箱で)

希釈は IHC (peroxidase blocking reagent)で行う。



Rinse in PBS-T 10min × 3



Labelled polymer 2<sup>nd</sup>, Ab (DAKO)

組織全体にかかる程度：2～3滴 RT, 1h



Rinse in PBS-T 10min × 3



**染色**

DAB 反応

Substrate solution

Buffer : DAB= 50 : 1

染色する直前に混和する。サンプルのウラの水気をよく拭き、顕微鏡でピントを合わせる。



DAB を組織全体にかかる程度のせ、(約 100 μl) ストップウォッチ start



顕微鏡を見ながら発色状況を確認 (発色時間は書き留めておく)



Rinse in PBS (以下の3ドーズを準備する)

(丸ドーズ→四角ドーズ①→四角ドーズ②の順で) 丸ドーズ PBS は DAB 用廃液入れへ



標本作製室にて Hematoxylin dye へ

水気をよく切ってから行う。2sec



Rinse in Water



脱水・透徹

アルコール ①4 min, ②30 sec, ③30 sec, ④30 sec, ⑤30 sec, ⑥4 min

キシレン ①4 min, ②30 sec, ③30 sec, ④30 sec, ⑤30 sec, ⑥4 min



封入