

明視野染色プロトコル

このプロトコルはビオチン標識された ISHpalette® Short hairpin amplifier(特注品)および Avidin-Biotin 相互作用を利用したプロトコルになります。

スライドガラスでの染色の場合は Streptavidin Peroxidase や Streptavidin Poly-HRP の浸透性が悪い為、なるべく厚さが薄めの切片をご用意して頂く事を推奨いたします。もし染色が薄い場合は濃度や反応時間をご検討ください。

通常プロトコルに加えて必要な試薬

- ・ Avidin ・ Biotin ブロッキング試薬(必要に応じて)
- ・ 30% 過酸化水素水
- ・ ビオチン標識された ISHpalette® Short hairpin amplifier(特注品)
- ・ Streptavidin Peroxidase (#016-030-084, Jackson) *
- ・ DAB Peroxidase Substrate Kit, ImmPACT (#SK-4105, Vector)*

*他社相当品であれば使用可能ですが最適な反応条件は異なります。

*ABC 法などの高分子を形成した Streptavidin を反応させる製品はご使用いただけません。

内在性 Avidin と Biotin のブロッキングについて

染色に使用する組織や生物種などの必要に応じて、9.と 10.の間に内在性の Avidin と Biotin のブロッキングを行ってください。

内在性ペルオキシダーゼの失活

2.の脱脂および透過処理のメタノールを 0.3-3% 過酸化水素/メタノールに変更する事で内在性ペルオキシダーゼの失活が行えます。通常の組織では0.3%の過酸化水素で問題ありませんが、内在性ペルオキシダーゼ活性が強い組織では3%まで濃度を上げることができます。

明視野染色の手順

必要に応じて 9.と 10.の間に内在性 Avidin と Biotin のブロッキングを行い ISHpalette® Short hairpin amplifier の手順に従って染色を行う。

13.までは通常通りのプロトコルを行ってください。

14. Biotin 標識ヘアピン DNA と HRP 標識 Streptavidin の反応

PBST で Streptavidin Peroxidase を 100 倍希釈して試料に適用し、37°C 60 分間（スライドガラス）もしくは室温 20 分間（浮遊切片など）反応させる。

Streptavidin Poly-HRP (#21140, Thermo Scientific™)など HRP ポリマーを利用した

製品でも染色実績があります。最終的な感度は上がりますが、単量体の Peroxidase より浸透性が悪くスライドガラス貼付切片の場合は表面のみが染色されるため、条件検討が必要です。浮遊切片の場合であればさほど問題はありません。

15. 洗浄:PBST 室温 5 分×2 回

PBST にスライドガラスまたは浮遊切片を室温で 5 分間浸し洗浄する。洗浄操作をもう一回繰り返す。

16. 発色

DAB Peroxidase Substrate Kit, ImmPACT を使用して室温で 5-10 分間発色させる。

17. 水洗・核染色・脱水・透徹・封入

- ・本プロトコルは製品の改良や仕様変更および改善のため、予告なく変更することがあります。
- ・本製品は他社製品の性能または使用につきましては対応しておりません。
- ・本製品は研究用です。臨床用途には使用できません。
- ・本開発製品は東邦大学 医学部 解剖学講座微細形態学分野 准教授 恒岡洋右先生が開発された技術(特許第 7482506 号)を用いて、東邦大学と共同で開発・製品化を行っております。