

## CD133/1 の免疫組織化学染色(ヒト)

オーダー番号: 130-090-422

### ▲ 準備する物

- 100%エタノール
- 100%メタノール
- ChemMate™ Target Retrieval Solution (10×) pH6.0 あるいは同等品  
(DakoCytomation, #2031)
- 30% (w/w) 過酸化水素水溶液
- CD133/1 (AC133) pure抗体 (ヒト) (50 μg/ml) ([#130-090-422](#))
- VECTASTAIN® ABC Kit (Mouse IgG) (Vector Laboratories, #PK-4002) あるいは同等品  
▲ VECTASTAIN® ABC Kit に含まれる試薬: blocking serum, biotinylated affinity-purified anti-mouse immunoglobulin antibody, Reagent A (Avidin DH solution), Reagent B (biotinylated horseradish peroxidase A).
- 3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) (Sigma, # D5637)
- Nickel(II) chloride (NiCl<sub>2</sub>)
- Tris base
- 塩化ナトリウム (NaCl)
- 塩酸 (HCl)
- メチルグリーン溶液もしくは Meyer' s hemalum
- リン酸緩衝食塩水 (PBS)
- 脱イオン水
- 水道水
- ウォーターバス
- Microwave
- 蛍光顕微鏡
- 疎水性のペン
- カバースライド
- Hellendahl jars (染色瓶)
- プラスチック製 Hellendahl jars (プラスチック染色瓶)
- 加湿容器
- Roti®-histol (Roth, # 6640.1) もしくはキシレン
- Roti®-Histol kit (Roth, # 6638.1) (封入剤)

## ▲ サンプル準備

- ポジティブコントロールをご用意下さい。(例 WERI-RB-1, Huh-7, Y79, GM-490 などの細胞株)
- 固定: 10% Formaline 液 もしくは 60% Methanol/30% Chloroform/10% Glacial acetic acid 固定液
  - ▲ 組織切片により最適な固定液および濃度が異なりますので、ご検討下さい。

## ▲ 試薬準備

★以下の保存液を用意

- エタノールの希釈:  
脱イオン水で希釈し 100%、96%、80%、70%エタノールをそれぞれ用意(室温)
- 10×トリスバッファー:  
Tris Base 61g と塩化ナトリウム 116.9g を1ℓの脱イオン水に溶解  
HCl で pH7.6(±0.1)に調整
- DAB 保存液:  
DAB テトラヒドロクロライド 5g を 132ml の 1×Tris Buffer に溶解  
4ml ずつに分注し-20°Cで保存

★以下の溶液は用時調製

- Target Retrieval Solution:  
10× Target Retrieval Solution を脱イオン水で希釈 (1:10)
- 3% 過酸化水素水(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>):  
30% 過酸化水素水を 100%メタノールで希釈 (1:10)
- VECTASTAIN ABC kit :  
Vector Laboratorie 社のプロトコルに従い試薬を用意 (プロトコル12で調製)
- NiCl<sub>2</sub> 溶液:  
8g の NiCl<sub>2</sub>を 100ml の脱イオン水に溶解し 4°Cで保存
  - ▲NiCl<sub>2</sub>は有毒なので注意
- DAB テトラヒドロクロライド溶液:  
4ml の DAB 保存液を 175ml の 1Xトリスバッファーで希釈後、ウォーターバスで 37°Cに加温

▲ プロトコル

※ 組織切片は、決して乾燥させないで下さい。バックグラウンドが生じます。

1. 厚さ 2  $\mu\text{m}$ 以下のパラフィン包埋組織切片を用意  
▼
2. 連続浸漬で組織切片を脱パラフィン処理後、再水和する  
2x5 min Roti-Histol もしくはキシレン  
2x2 min 100% エタノール  
2x2 min 96% エタノール  
2x2 min 80% エタノール  
2x2 min 70% エタノール  
1x5 min PBS  
1x 脱イオン水で軽くリンス  
▼
3. 抗原の賦活化には、プラスチック製 Hellendahl Jar に 1xTarget Retrieval Solution を用意し、組織切片を完全に浸す。覆いなしで、250-300W で 15 分程 Microwave にかける。蒸発した分量だけ Target retrieval Solution をつぎ足し、室温に戻るまで放置。  
▼
4. 脱イオン水で洗浄(1x5分)し、さらに PBS で洗浄(1x5分)  
▼
5. 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ 溶液にスライドを浸漬し、内因性ペルオキシターゼ活性をブロック (室温・30分)  
▲内因性ペルオキシターゼの低い組織切片の場合は、インキュベーション時間を 10 分まで短縮できます  
▼
6. PBS で洗浄 (2x3分)  
▼
7. 組織の周りの水分をふき取った後、疎水性のペンで組織を囲む  
▼
8. スライドを加湿容器内に静置し、blocking serum を適量のせインキュベートすることで、CD133/1 (AC133) pure 抗体の非特異的結合をブロッキング (室温・20分)  
▼
9. スライドを傾けてブロッキング液をキムワイブ等に吸わせる。スライドは洗浄しない。  
▼
10. スライドを加湿容器内に静置し、VECTASTAIN ABC kit blocking serum で希釈した CD133/1 (AC133) pure 抗体 (1:10-1:50)を 50-250  $\mu\text{L}$  ずつ各切片にのせインキュベート (室温・1時間 もしくは 4°C・O/N)  
▲抗体の最適な作用濃度は、切片の厚さや組織のタイプによって異なるため、予め検討してください  
▲ネガティブコントロールは ECTASTAIN ABC kit blocking serum もしくはマウス正常血清  
▼

11. PBS で洗淨 (2x3 分)  
▼
12. スライドを加湿容器内に静置し、VECTASTAIN ABC kit blocking serum で希釈した VECTASTAIN ABC kit ビオチン化二次抗体を 50–250 $\mu$ L ずつ各切片にのせインキュベート (室温・30 分)  
▲この間に VECTASTAIN ABC 試薬をキットのプロトコルに従い準備する。(ABC 試薬は、使用前に室温で 30 分 インキュベーションする必要があるため)  
▼
13. PBS で洗淨 (2x3 分)  
▼
14. スライドを加湿容器内に静置し、VECTASTAIN ABC 試薬を 50–250 $\mu$ L ずつ各切片にのせインキュベート (室温・30 分)  
▼
15. PBS で洗淨 (2x3 分)  
▼
16. 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.1mL と NiCl<sub>2</sub> 溶液 1mL を、予め 37°C に加温していた DAB テトラヒドロクロライド溶液に加える  
▲NiCl<sub>2</sub>は有毒なので注意!  
▼
17. DAB 溶液に組織切片を浸漬しインキュベート (ウォーターバスで 37°C 10 分)  
▼
18. 水道水で洗淨 (2x3 分)  
▼
19. マイヤーのヘマトキシリン液等による核染色 (室温・1–2 分) 時々振盪する  
▼
20. 流水 (1–5 分) 時々、顕微鏡で染色像を確認し最適ところで次に進む  
▼
21. 連続浸漬で組織切片を脱水  
96%のエタノールに軽く浸漬 (2 回)  
100%のエタノールに軽く浸漬 (3 回)  
▲最後のエタノール液による浸漬後、組織切片は透明になります  
Roti-Histol もしくはキシレン (2x5 分)  
▼
22. Roti-histol kit もしくは同等品で切片を封入し、カバースライドをかける。