

***Can Get Signal*[®] immunostain** **Immunoreaction Enhancer Solution**

(Code No. NKB-401、NKB-501、NKB-601)

取扱説明書

TOYOBO CO., LTD. Life Science Department
OSAKA JAPAN

A3327K

－ 目 次 －

[1] はじめに	1
[2] 製品内容	2
[3] 使用方法	3
[4] パラフィン包埋切片の染色法	4
[5] 凍結切片の染色法	6
[6] 試薬の調製法	7
[7] トラブルシューティング	8
[8] 関連商品	9

ご注意

本キットに含まれる試薬は、すべて研究用試薬です。診断・臨床用試薬として決して使用しないでください。本キットの使用にあたっては、実験室での一般の注意事項を厳守し、安全に留意してください。

[1] はじめに

Can Get Signal[®] immunostain は、免疫組織染色、免疫細胞染色の解析でしばしば問題になる、感度不足や低い S/N 比、二次抗体由来の非特異シグナルの発生等を改善するために開発された反応促進試薬です。従来、低い抗体力価による検出感度不足の問題は、添加する抗体濃度を高めることにより補われて来ましたが、バックグラウンドや非特異染色を増加させる原因ともなっていました。本製品の使用で抗原抗体反応を促進することにより、抗体濃度至適化に対する自由度を高め、過剰量の抗体添加による非特異反応を抑えた、より明瞭な染色像を得ることができるようになります。

◆本製品の特長◆

1: 免疫染色のシグナルを増強

Can Get Signal[®] immunostain は、抗原と抗体との反応を促進する効果があり、従来法に比べ高いシグナルを得ることができます。二次抗体の使用量を抑えたり、あるいは蛍光・発光による検出系では露光時間を短縮することによって、バックグラウンドの上昇を抑えた高い S/N 比の像を得ることができます。

2: さまざまな抗体に対応

Can Get Signal[®] immunostain は、抗体に対する効果の異なる Solution A と Solution B とがあり、ご使用の実験系に合わせ、より適した試薬を選択することができます(初回の検討の際には、両方の溶液がセットになった Starter Set (次頁参照)をご使用ください)。

3: 広い汎用性

Can Get Signal[®] immunostain は、標識酵素や蛍光色素へ影響を与えない成分から構成されており、化学発色、化学発光、蛍光などいずれの検出系にも使用することができます。また ABC 法や、ポリマーコンプレックス法などの増感システムと併用することも可能です。

4: 使いやすい Ready-to-Use タイプ

Can Get Signal[®] immunostain は、希釈せずにそのままご使用いただけます。

[2] 製品内容

本製品には、以下のパーツが含まれています。

品名および内容	包装	Code No.
Can Get Signal[®] immunostain Starter Set Solution A Solution B	各 5ml × 1 本	NKB-401
Can Get Signal[®] immunostain Solution A	20ml × 1 本 (20ml × 1 本) × 4	NKB-501 NKB-501X4
Can Get Signal[®] immunostain Solution B	20ml × 1 本 (20ml × 1 本) × 4	NKB-601 NKB-601X4

全ての試薬は、4°C で暗所にて保存してください。

[3] 使用方法

- (1)本試薬により、抗体(一次抗体、標識二次抗体)を使用濃度に希釈し、そのままアッセイに用いてください。通常、抗体の希釈に用いるTBS(TBS-T)、PBS(PBS-T)、希釈ブロッキング液などの代替としてご使用ください。
- (2)本試薬を使用することにより、抗原抗体反応が促進され、従来より強いシグナルが得られるようになります。反応性の向上により、同時にバックグラウンドの増加が認められる場合があります。その場合は、抗体濃度の至適条件がシフトしていると考えられ、従来法と同じ条件では最適な染色像が得られない可能性があります。一次抗体濃度や検出用の二次抗体濃度の検討、あるいはシグナルの検出時間(露光時間)等の再調整を行ってください。
- (3)本試薬には、Solution AとSolution Bの2タイプがあります(製品内容の構成は前頁を参照ください)。Solution AとSolution Bは、抗体に対する効果に違いがあり、どちらがより適しているかは抗体・抗原の種類やサンプルの形状等により異なります。各アッセイ系の初回検討時に、両タイプの溶液を使用して比較を行った上で、より適した溶液を選択してください。なお、溶液選択の検討用として、2タイプの溶液が両方セットされたStarter Set(前頁参照)がご利用いただけます。

※ご注意※

- ・ あらかじめ使用濃度に調製された標識二次抗体やポリマーコンプレックス試薬を検出に用いる際は、本試薬は一次抗体の希釈のみにご使用ください。ただし、これらの二次抗体試薬を希釈して使用する場合は、本試薬を希釈液としてご使用いただくことも可能です。
- ・ 本試薬は、ブロッキング反応や、ABC法におけるアビジン-ビオチン複合体形成反応等の、抗原抗体反応以外のステップには使用できません。本試薬にはこれらの反応に対する促進効果はなく、場合によっては逆効果となることがあります。

[4] パラフィン包埋切片の染色法

参考例として、ABC 法を用いたペルオキシダーゼ化学発色による免疫組織染色法をご紹介します。ここに記載した方法以外にも、他の酵素や蛍光色素を標識体として用いる場合や、チラミドを用いた増感システムを用いる場合など、免疫染色法には様々な手順がありますが、*Can Get Signal*[®] immunostain はいずれの場合にもご使用いただけます。あらかじめ使用濃度に調製された二次抗体試薬や、ENVISION+ (ダコ・サイトメーション)、ヒストファイン・シンプルステイン(ニチレイ)等の、ポリマーコンプレックス法による試薬を用いる際は、「(4) 使用濃度に調製された二次抗体試薬を用いた染色法」もご参照ください。

(1) 用意する器具類

- | | | |
|----------------|---------|----------|
| ・染色ビン(ドーゼ) | ・湿潤箱 | ・スライドガラス |
| ・免疫組織染色用マーカーペン | ・カバーガラス | ・タイマー |
| ・封入剤 | | |

(2) 用意する試薬類

(*印のものについては、[6] 試薬の調製法もご参照ください)

- | | | |
|---------------------|-------|------------|
| ・エタノール | ・キシレン | ・PBS* |
| ・内因性ペルオキシダーゼ失活処理液* | | ・ブロッキング溶液* |
| ・発色基質溶液(TMB、DAB など) | | |

(3) 染色方法

1. 作製したパラフィン切片を、キシレンを用いて脱パラフィンを行い(100%キシレン x 5分間、2回)、その後エタノールを用いて水和します。
2. 蒸留水で5分以上洗浄します。
3. 内因性ペルオキシダーゼの失活処理が必要な場合には、内因性ペルオキシダーゼ失活処理液で切片中の内因性ペルオキシダーゼを10分間失活処理します。
4. 蒸留水で5分間洗浄し、次いでPBSで5分間の洗浄を2回行います。
5. 切片上にブロッキング溶液を100 μ l滴下し、60分間ブロッキングします。

6. 切片上の余分なブロッキング液を取り除いた後、**Can Get Signal[®] immunostain Solution A** 又は **Solution B** であらかじめ希釈した一次抗体溶液を切片上に約 100 μ l 滴下し、60 分間反応させます。
 - ・ Solution A 又は Solution B の選択、または抗体の希釈濃度に関しては、[3] **使用方法** をご参照ください。
 - ・ BSA、カゼイン、正常血清等のブロッキング剤と組み合わせて使用することも可能です。抗体を希釈する前に、これらのブロッキング液をあらかじめ本製品に混合してからご使用ください。
7. PBS で 5 分間の洗浄を 3 回行います。
8. 切片上の余分な PBS を取り除いた後、**Can Get Signal[®] immunostain Solution A** 又は **Solution B** であらかじめ希釈した二次抗体溶液を切片上に約 100 μ l 滴下し、60 分間反応させます。
 - ・ Solution A 又は Solution B の選択、または抗体の希釈濃度に関しては、[3] **使用方法** をご参照ください。
 - ・ BSA、カゼイン、正常血清等のブロッキング剤と組み合わせて使用することも可能です。抗体を希釈する前に、これらのブロッキング液をあらかじめ本製品に混合してからご使用ください。
9. PBS で 5 分間の洗浄を 3 回行います。
10. 切片上の余分な PBS を取り除いた後、アビジン-ビオチン複合体溶液を切片上に 100 μ l 滴下し、30 分間反応させます。アビジン-ビオチン複合体溶液は、使用 30 分前に調製した溶液をご使用ください。
11. PBS で 5 分間の洗浄を 3 回行います。
12. 切片上の余分な PBS を取り除いた後、発色基質溶液を切片上に約 200 μ l 滴下し、発色させます。発色時間については実験系によって大きく異なりますので、顕微鏡で観察しつつ、適当なところで反応を停止させてください。
13. 蒸留水中に浸け、反応を停止させます。
14. グリセリンや封入剤で封入し、観察します。必要に応じて対比染色を行った後、エタノール、キシレンを用いて脱水後、封入剤で封入し、観察します。

封入剤の種類は、用いる発色剤の種類により使用できる物が異なります。ご使用の際には発色剤または封入剤に添付されている取扱説明書の内容をよくご確認ください。

(4) 使用濃度に調製された二次抗体試薬を用いた染色法

あらかじめ使用濃度に調製された二次抗体試薬や、ENVISION+ (ダコ・サイトメーション)、ヒストファイン・シンプルステイン(ニチレイ)等の、ポリマーコンプレックス法による試薬を用いる際は、本試薬は一次抗体の希釈のみにご使用ください。

1. 上記「(3)染色方法」の 1.から 7.を行います。
2. 切片上の余分な PBS を取り除いた後、二次抗体試薬を切片上に 100µl 滴下し、30 分間反応させます。
反応液量、温度、時間等については、各試薬に添付されている取扱説明書の記載内容に従ってください。また、二次抗体試薬を希釈して使用したい場合は、**Can Get Signal[®] immunostain Solution A** 又は **Solution B** を希釈液として用いることができます。
3. 上記「(3)染色方法」の 9 以降を行います。
本ステップ以降の洗浄条件、発色反応条件等については、各試薬に添付されている取扱説明書の記載内容に従ってください。

[5] 凍結切片の染色法

1. PBS で 10 分間の洗浄を 3 回行います。
2. 染色する直前に、アセトン固定など標識抗原にあった固定液により切片を固定します。
3. PBS で 10 分間洗浄します。
4. 内因性ペルオキシダーゼの失活処理が必要な場合には、パラフィン包埋切片の染色法の 3.と同じ操作をします。
5. PBS で 5 分間の洗浄を 3 回行います。
6. [4]パラフィン包埋切片の染色法の 5.以降を行います。

[6] 試薬の調製法

・10x PBS(-) (10x PBS) (500ml)

43 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (MW = 268.07)

14 mM KH_2PO_4 (MW = 136.09)

27 mM KCl (MW = 74.55)

1.37 M NaCl (MW = 58.44)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を 5.75g、 KH_2PO_4 を 1.0g、 NaCl を 40.0g、 KCl を 1.0g はかりとり、蒸留水に溶解して液量を 500ml に合わせ、10x 溶液を調製します。必要に応じてオートクレーブ滅菌し、冷蔵もしくは室温で保存してください。

10x PBS は冷蔵保存した場合、塩濃度が高いため析出物が現れることがあります。その際は、37°C のウォーターバス等により加温し、析出物を完全に溶解させてからご使用ください。

1x 溶液は、10x 溶液を蒸留水もしくは滅菌した蒸留水で 10 倍希釈して調製します。調製後は、冷蔵もしくは室温で保存してください。

・内因性ペルオキシダーゼ失活処理液(0.3%過酸化水素/メタノール溶液) (200ml)

メタノール 194ml に、10%過酸化水素水 6ml を加え、混合します(急激な発熱を防ぐため、混合順序を逆にしないように注意)。用時調製してください。

・ブロッキング溶液(1.5%正常血清/PBS) (10ml)

1x PBS(-) 10ml にヤギ正常血清を 150 μl 入れてください。

ブロッキング剤として正常血清を用いる際は、二次抗体の由来する動物種のものを用いるのが一般的です。

[7] トラブルシューティング

トラブル	原因	対策
バックグラウンドが高い、あるいは非特異染色が生じる。	本試薬の使用により、一次抗体の至適濃度が低下した。	一次抗体濃度を下げてください。
	二次抗体濃度が高い。	二次抗体濃度を下げてください。あらかじめ使用濃度に調製済みの二次抗体試薬をご使用の際は、本製品を用いて希釈を行ってください。
	ブロッキング条件が不適当。	ブロッキング時間の長短が染色結果に大きく影響を及ぼす場合がありますので、ブロッキング時間の検討を行ってください。また、ブロッキング剤の種類を変更することで効果がある場合もあります。
	洗浄が不十分。	洗浄時間、回数を増やしてください。
	内因性ペルオキシダーゼ活性の残存(ペルオキシダーゼ標識抗体使用時)	失活処理時間を長くしてください。または、過酸化水素濃度を3%まで上げてください。
	露光時間が長い(蛍光染色法)	露光時間を短くしてください。
シグナルが弱い。	一次抗体濃度が低い。	抗体濃度を上げてください。
	ブロッキングが過剰。	ブロッキング時間の長短が染色能に大きく影響を及ぼす場合がありますので、ブロッキング時間の検討を行ってください。また、ブロッキング剤の種類を変更することで効果がある場合もあります。
	洗浄が過剰。	洗浄時間、回数を減らしてください。
	抗原性が失活している。	固定法が不適切である場合があります。固定法を変えてください。また、抗原賦活化処理を行うことで改善される場合があります。
	抗原性がマスキングされている。	試料の性質によっては、抗体が抗原まで物理的に到達できない状態にあることが考えられます。抗原賦活化処理により、抗原性の賦活化処理を行ってください。

	賦活化処理が不適當。	賦活化処理が過剰な場合、逆に抗原性が失われることがあります。賦活化処理の条件を十分に検討してください。
	露光時間が長すぎる(蛍光染色法)	励起光の照射時間が長すぎると、蛍光色素が退色します。露光時間を短くしてください。
封入したサンプルの安定性が悪い	封入剤が不適當	封入剤の種類は、用いる発色剤の種類により使用できる物が異なります。また、Alexa Fluor シリーズの蛍光色素は、一般的な蛍光色素用封入剤が使用できない場合があります。発色剤・蛍光色素または封入剤に添付されている取扱説明書の内容をよくご確認ください。

[8] 関連商品

品名および内容	包装	保存温度	Code No.	価格
<i>Can Get Signal</i> [®] Immunoreaction Enhancer Solution (ウェスタンブロット・ELISA 用)				
標準サイズ (一次・二次抗体用溶液)	各 250mlx1 本	4°C	NKB-101	¥30,000
トライアルサイズ (一次・二次抗体用溶液)	各 50mlx1 本	4°C	NKB-101T	¥10,000
一次抗体用溶液のみ	250mlx1 本	4°C	NKB-201	¥17,000
二次抗体用溶液のみ	250mlx1 本	4°C	NKB-301	¥17,000

◆東洋紡では、下記の抗体メーカーの商品を取り扱っています。詳しくは、当社オンラインカタログ、または各社ホームページをご覧ください。

東洋紡株式会社ライフサイエンス事業部 オンラインカタログ www.bio.toyobo.co.jp/bio01

・ **Santa Cruz 社** www.scbt.com

シグナル伝達関係タンパク質をメインとした抗体を幅広く取り扱っています。そのほか、免疫アッセイ用各種試薬・キット等も取り揃えています。

・ **PeproTech 社** www.peprotech.com

成長因子、サイトカインに対する抗体を取り揃えています。



【製造・販売元】

－納期・注文に関するお問い合わせ－

東洋紡株式会社 ライフサイエンス事業部 (大阪)
〒530-8230 大阪市北区堂島浜二丁目 2 番 8 号
TEL 06-6348-3786 FAX 06-6348-3833
E-mail : order_lifescience@toyobo.jp

東洋紡株式会社 ライフサイエンス事業部 (東京)
〒104-8345 東京都中央区京橋一丁目 17 番 10 号 住友商事京橋ビル
TEL 03-6887-8819 FAX 03-6887-8951
E-mail : order_lifescience@toyobo.jp

－製品の内容・技術に関するお問い合わせ－

テクニカルライン
TEL 06-6348-3888 FAX 06-6348-3833
開設時間 9:00～12:00 , 13:00～17:00 (土、日、祝を除く)
E-mail : tech_osaka@toyobo.jp
[URL] <http://www.toyobo.co.jp/bio>