

1. パラフィン切片 / LSAB法

処理	温度	時間	回数
パラフィン切片			
↓			
ベーキング	60℃	1時間	<input type="checkbox"/>
↓			
脱パラフィン			
↓ キシレンまたは代替剤1	室温	10分間	<input type="checkbox"/>
↓ キシレンまたは代替剤2	室温	10分間	<input type="checkbox"/>
↓ 100%エタノール1	室温	10分間	<input type="checkbox"/>
↓ 100%エタノール2	室温	10分間	<input type="checkbox"/>
↓ 90%エタノール	室温	5分間	<input type="checkbox"/>
↓ 80%エタノール	室温	5分間	<input type="checkbox"/>
↓ 蒸留水	室温	5分間	3回 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
↓			
PBS	室温		<input type="checkbox"/>
↓			
抗原賦活化処理			<input type="checkbox"/>
・熱処理			
・酵素処理			
・無処理			
↓			
0.3%過酸化水素 / メタノール	室温	30分間	<input type="checkbox"/>
↓			
TBS	室温	5分間	3回 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
↓			
ブロッキング G-Block (ジェノスタッフ社)	室温	10分間	<input type="checkbox"/>
↓			
TBS			<input type="checkbox"/>
↓			
Avidin/Biotin Block Kit (Vector Laboratories社)			
↓ sol.1 (avidin)	室温	15分間	<input type="checkbox"/>
↓ TBS	室温	5分間	<input type="checkbox"/>
↓ sol.2 (biotin)	室温	15分間	<input type="checkbox"/>
↓ TBS	室温	5分間	<input type="checkbox"/>
↓			
一次抗体	4℃	一晩	<input type="checkbox"/>
1%G-Block/TBSで希釈			
抗体濃度 <u> ug/ml (精製抗体) or 倍希釈 (抗血清) </u>			
<u> ug/ml (精製抗体) or 倍希釈 (抗血清) </u>			
<u> ug/ml (精製抗体) or 倍希釈 (抗血清) </u>			
↓			
TBST	室温	5分間	2回 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
↓			
TBS	室温	5分間	<input type="checkbox"/>
↓			
二次抗体	室温	30分間	<input type="checkbox"/>
1% G-Block/TBSで製品添付文書の濃度に従い希釈			
抗体濃度 <u> ug/ml or 倍希釈 </u>			
↓			
TBST	室温	5分間	2回 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
↓			
TBS	室温	5分間	1回 <input type="checkbox"/>
↓			
SAB-PO (ニチレイバイオサイエンス社 #426061)	室温	5分間	<input type="checkbox"/>
↓			
TBST	室温	5分間	2回 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
↓			
TBS	室温	5分間	1回 <input type="checkbox"/>
↓			
DABで発色	室温	検鏡しながら停止	<input type="checkbox"/>
↓			
流水	室温	10分間	<input type="checkbox"/>
↓			
G-DAPup (ジェノスタッフ社 #DCE-01)	室温	10分間	<input type="checkbox"/>
↓			
蒸留水で洗浄			<input type="checkbox"/>
↓			
ヘマトキシリン	室温	2~3秒	<input type="checkbox"/>
↓			
流水	室温	10分間	<input type="checkbox"/>
↓			
脱水系列			
↓ 70%エタノール	室温	5分間	<input type="checkbox"/>
↓ 90%エタノール	室温	5分間	<input type="checkbox"/>
↓ 100%エタノール1	室温	5分間	<input type="checkbox"/>
↓ 100%エタノール2	室温	5分間	<input type="checkbox"/>
↓ キシレンまたは代替剤1	室温	5分間	<input type="checkbox"/>
↓ キシレンまたは代替剤2	室温	5分間	<input type="checkbox"/>
↓			
封入 マリノールなど			<input type="checkbox"/>

2. パラフィン切片 / イムノポリマー法

処理	温度	時間	回数
パラフィン切片			
↓			
ベーキング	60°C	1時間	□
↓			
脱パラフィン			
↓ キシレンまたは代替剤1	室温	10分間	□
↓ キシレンまたは代替剤2	室温	10分間	□
↓ 100%エタノール1	室温	10分間	□
↓ 100%エタノール2	室温	10分間	□
↓ 90%エタノール	室温	5分間	□
↓ 80%エタノール	室温	5分間	□
↓ 蒸留水	室温	5分間	3回 □□□
↓			
PBS	室温		□
↓			
抗原賦活化処理			□
・熱処理			
・酵素処理			
・無処理			
↓			
0.3%過酸化水素 / メタノール	室温	30分間	□
↓			
TBS	室温	5分間	3回 □□□
↓			
ブロッキング G-Block (ジェノスタッフ社)	室温	10分間	□
↓			
TBS			□
↓			
一次抗体	4°C	一晩	□
1% G-Block/TBSで希釈			
抗体濃度 <u>ug/mL</u> (精製抗体) or <u>倍希釈 (抗血清)</u>			
<u>ug/mL</u> (精製抗体) or <u>倍希釈 (抗血清)</u>			
<u>ug/mL</u> (精製抗体) or <u>倍希釈 (抗血清)</u>			
↓			
TBST	室温	5分間	2回 □□
↓			
TBS	室温	5分間	□
↓			
二次抗体	室温	30分間	□
ポリマー試薬 (シンプルスチーン, EnVisionなど)			
↓			
TBST	室温	5分間	2回 □□
↓			
TBS	室温	5分間	1回 □
↓			
DABで発色	室温	検鏡しながら停止	□
↓			
流水	室温	10分間	□
↓			
G-DAPup (ジェノスタッフ社 #DCE-01)	室温	10分間	□
↓			
蒸留水で洗浄			□
↓			
ヘマトキシリン	室温	2~3秒	□
↓			
流水	室温	10分間	□
↓			
脱水系列			
↓ 70%エタノール	室温	5分間	□
↓ 90%エタノール	室温	5分間	□
↓ 100%エタノール1	室温	5分間	□
↓ 100%エタノール2	室温	5分間	□
↓ キシレンまたは代替剤1	室温	5分間	□
↓ キシレンまたは代替剤2	室温	5分間	□
↓			
封入 マリノールなど			□

3. パラフィン切片 / マウスonマウス（マウスの組織をマウス抗体で染色する方法）

処理	温度	時間	回数
パラフィン切片			
↓			
ベーキング	60°C	1時間	□
↓			
脱パラフィン			
↓ キシレンまたは代替剤1	室温	10分間	□
↓ キシレンまたは代替剤2	室温	10分間	□
↓ 100%エタノール1	室温	10分間	□
↓ 100%エタノール2	室温	10分間	□
↓ 90%エタノール	室温	5分間	□
↓ 80%エタノール	室温	5分間	□
↓ 蒸留水	室温	5分間	3回 □□□
↓			
PBS	室温		□□□
↓			
抗原賦活化処理			□
・熱処理			
・酵素処理			
・無処理			
↓			
0.3%過酸化水素 / メタノール	室温	30分間	□
↓			
PBS	室温	5分間	3回 □□□
↓			
プロッキング試薬A（ニチレイ マウスステインキット付属）	室温	1時間	□
↓			
PBS	室温	5分間	3回 □□□
↓			
一次抗体	4°C	一晩	□
1% G-Block/PBSで希釈			
抗体濃度 <u>ug/mL</u> (精製抗体) or <u>倍希釈 (抗血清)</u>			
<u>ug/mL</u> (精製抗体) or <u>倍希釈 (抗血清)</u>			
<u>ug/mL</u> (精製抗体) or <u>倍希釈 (抗血清)</u>			
↓			
PBS	室温	5分間	3回 □□□
↓			
プロッキング試薬B（ニチレイ マウスステインキット付属）	室温	10分間	□
↓			
PBS	室温	5分間	3回 □□□
↓			
二次抗体	室温	10分間	□
シンプルステインマウスMAX-PO(M) (キット付属)			
↓			
PBS	室温	5分間	3回 □□□
↓			
DABで発色	室温	検鏡しながら停止。	□
↓			
流水	室温	10分間	□
↓			
G-DAPup (ジェノスタッフ社 #DCE-01)	室温	10分間	□
↓			
蒸留水で洗浄			□
↓			
ヘマトキシリン	室温	2~3秒	□
↓			
流水	室温	10分間	□
↓			
脱水系列			
↓ 70%エタノール	室温	5分間	□
↓ 90%エタノール	室温	5分間	□
↓ 100%エタノール1	室温	5分間	□
↓ 100%エタノール2	室温	5分間	□
↓ キシレンまたは代替剤1	室温	5分間	□
↓ キシレンまたは代替剤2	室温	5分間	□
↓			
封入 マリノールなど			□

4. 既固定凍結切片 / LSAB法

処理	温度	時間	回数	
既固定凍結切片				
↓				
PBS (コンパウンド除去)	室温	5分間	3回	□□□
染色中に組織が剥がれる場合、PBSを10% NBFに変更すると改善することがある。10% NBFの後はPBSで洗浄する (室温 5分間×3回)				
↓				
抗原賦活化処理			□	
・熱処理				
・酵素処理				
・無処理				
↓				
0.3%過酸化水素 / メタノール	室温	30分間	□	
↓				
TBS	室温	5分間	3回	□□□
↓				
ブロッキング G-Block (ジェノスタッフ社)	室温	10分間	□	
↓				
TBS			□	
↓				
Avidin/Biotin Block Kit (Vector Laboratories社)				
↓ sol.1 (avidin)	室温	15分間	□	
↓ TBS	室温	5分間	□	
↓ sol.2 (biotin)	室温	15分間	□	
↓ TBS	室温	5分間	□	
↓				
一次抗体	4℃	一晩	□	
1%G-Block/TBSで希釈				
抗体濃度 <u>ug/mL</u> (精製抗体) or <u>倍希釈 (抗血清)</u>				
<u>ug/mL</u> (精製抗体) or <u>倍希釈 (抗血清)</u>				
<u>ug/mL</u> (精製抗体) or <u>倍希釈 (抗血清)</u>				
↓				
TBS	室温	5分間	3回	□□□
↓				
二次抗体	室温	30分間	□	
1%G-Block/TBSで製品添付文書の濃度に従い希釈				
抗体濃度 <u>ug/mL</u> or <u>倍希釈</u>				
↓				
TBS	室温	5分間	3回	□□□
↓				
SAB-PO (ニチレイバイオサイエンス社 #426061)	室温	5分間	□	
↓				
TBS	室温	5分間	3回	□□□
↓				
DABで発色	室温	検鏡しながら停止。	□	
↓				
流水	室温	10分間	□	
↓				
G-DAPup (ジェノスタッフ社 #DCE-01)	室温	10分間	□	
↓				
蒸留水で洗浄			□	
↓				
ヘマトキシリン	室温	2~3秒	□	
↓				
流水	室温	10分間	□	
↓				
脱水系列				
↓ 70%エタノール	室温	5分間	□	
↓ 90%エタノール	室温	5分間	□	
↓ 100%エタノール1	室温	5分間	□	
↓ 100%エタノール2	室温	5分間	□	
↓ キシレンまたは代替剤1	室温	5分間	□	
↓ キシレンまたは代替剤2	室温	5分間	□	
↓				
封入 マリノールなど			□	

5. 既固定凍結切片 / イムノポリマー法

処理	温度	時間	回数
既固定凍結切片			
↓			
PBS（コンパウンド除去）	室温	5分間	3回
染色中に組織が剥がれる場合、PBSを10% NBFに変更すると改善することがある。10% NBFの後はPBSで洗浄する (室温 5分間×3回)			□□□
↓			
抗原賦活化処理			□
・熱処理			
・酵素処理			
・無処理			
↓			
0.3%過酸化水素 / メタノール	室温	30分間	□
↓			
TBS	室温	5分間	3回
↓			
ブロックング G-Block (ジェノスタッフ社)	室温	10分間	□
↓			
TBS			□
↓			
一次抗体	4°C	一晩	□
1%G-Block/TBSで希釈			
抗体濃度 <u> μg/mL (精製抗体) or 倍希釈 (抗血清)</u>			
<u> μg/mL (精製抗体) or 倍希釈 (抗血清)</u>			
<u> μg/mL (精製抗体) or 倍希釈 (抗血清)</u>			
↓			
TBS	室温	5分間	3回
↓			
二次抗体	室温	30分間	□
ポリマー試薬 (シンプルステイン、EnVisionなど)			
↓			
TBS	室温	5分間	3回
↓			
DABで発色	室温	検鏡しながら停止。	□
↓			
流水	室温	10分間	□
↓			
G-DAPup (ジェノスタッフ社 #DCE-01)	室温	10分間	□
↓			
蒸留水で洗浄			□
↓			
ヘマトキシリン	室温	2~3秒	□
↓			
流水	室温	10分間	□
↓			
脱水系列			
↓ 70%エタノール	室温	5分間	□
↓ 90%エタノール	室温	5分間	□
↓ 100%エタノール1	室温	5分間	□
↓ 100%エタノール2	室温	5分間	□
↓ キシレンまたは代替剤1	室温	5分間	□
↓ キシレンまたは代替剤2	室温	5分間	□
↓			
封入 マリノールなど			□

6. 既固定凍結切片 / マウスonマウス（マウスの組織をマウス抗体で染色する方法）

処理	温度	時間	回数
既固定凍結切片			
↓			
PBS（コンパウンド除去）	室温	5分間	3回
染色中に組織が剥がれる場合、PBSを10% NBFに変更すると改善することがある。10% NBFの後はPBSで洗浄する (室温 5分間×3回)			□□□
↓			
抗原賦活化処理			□
・熱処理			
・酵素処理			
・無処理			
↓			
0.3%過酸化水素 / メタノール	室温	30分間	□
↓			
PBS	室温	5分間	3回
↓			
ブロッキング試薬A（ニチレイ マウスステインキット付属）	室温	1時間	□
↓			
PBS	室温	5分間	3回
↓			
一次抗体	4℃	一晩	□
1% G-Block/PBSで希釈			
抗体濃度 <u>ug/mL</u> (精製抗体) or <u>倍希釈 (抗血清)</u>			
<u>ug/mL</u> (精製抗体) or <u>倍希釈 (抗血清)</u>			
<u>ug/mL</u> (精製抗体) or <u>倍希釈 (抗血清)</u>			
↓			
PBS	室温	5分間	3回
↓			
ブロッキング試薬B（ニチレイ マウスステインキット付属）	室温	10分間	□
↓			
PBS	室温	5分間	3回
↓			
二次抗体	室温	10分間	□
シンプルステインマウスMAX-PO(M) (キット付属)			
↓			
PBS	室温	5分間	3回
↓			
DABで発色	室温	検鏡しながら停止。	□
↓			
流水	室温	10分間	□
↓			
G-DAPup (ジェノスタッフ社 #DCE-01)	室温	10分間	□
↓			
蒸留水で洗浄			□
↓			
ヘマトキシリン	室温	2~3秒	□
↓			
流水	室温	10分間	□
↓			
脱水系列			
↓70%エタノール	室温	5分間	□
↓90%エタノール	室温	5分間	□
↓100%エタノール1	室温	5分間	□
↓100%エタノール2	室温	5分間	□
↓キシレンまたは代替剤1	室温	5分間	□
↓キシレンまたは代替剤2	室温	5分間	□
↓			
封入 マリノールなど			□

7. 未固定凍結切片 / LSAB法

処理	温度	時間	回数
未固定凍結切片			
↓			
固定 (以下のいずれか)			<input type="checkbox"/>
・4%PFA または 10%中性緩衝ホルマリン	室温	10分間	
・メタノール	室温	10分間	
・冷アセトン	4℃または-20℃	10分間	
メタノール、冷アセトンの場合は、固定後にドライヤーの冷風で5~10分間乾燥させる。			
↓			
PBS	室温	5分間	3回
↓			
0.3%過酸化水素 / メタノール	室温	30分間	<input type="checkbox"/>
↓			
TBS	室温	5分間	3回
↓			
ブロッキング G-Block (ジェノスタッフ社)	室温	10分間	<input type="checkbox"/>
↓			
TBS			<input type="checkbox"/>
↓			
Avidin/Biotin Block Kit (Vector Laboratories社)			
↓ sol.1 (avidin)	室温	15分間	<input type="checkbox"/>
↓ TBS	室温	5分間	<input type="checkbox"/>
↓ sol.2 (biotin)	室温	15分間	<input type="checkbox"/>
↓ TBS	室温	5分間	<input type="checkbox"/>
↓			
一次抗体	4℃	一晩	<input type="checkbox"/>
1%G-Block/TBSで希釈			
抗体濃度 <u>ug/mL</u> (精製抗体) or <u>倍希釈 (抗血清)</u>			
<u>ug/mL</u> (精製抗体) or <u>倍希釈 (抗血清)</u>			
<u>ug/mL</u> (精製抗体) or <u>倍希釈 (抗血清)</u>			
↓			
TBS	室温	5分間	3回
↓			
二次抗体	室温	30分間	<input type="checkbox"/>
1%G-Block/TBSで製品添付文書の濃度に従い希釈			
抗体濃度 <u>ug/mL</u> or <u>倍希釈</u>			
↓			
TBS	室温	5分間	3回
↓			
SAB-PO (ニチレイバイオサイエンス社 #426061)	室温	5分間	<input type="checkbox"/>
↓			
TBS	室温	5分間	3回
↓			
DABで発色	室温	検鏡しながら停止。	<input type="checkbox"/>
↓			
流水	室温	10分間	<input type="checkbox"/>
↓			
G-DAPup (ジェノスタッフ社 #DCE-01)	室温	10分間	<input type="checkbox"/>
↓			
蒸留水で洗浄			<input type="checkbox"/>
↓			
ヘマトキシリン	室温	2~3秒	<input type="checkbox"/>
↓			
流水	室温	10分間	<input type="checkbox"/>
↓			
脱水系列			
↓ 70%エタノール	室温	5分間	<input type="checkbox"/>
↓ 90%エタノール	室温	5分間	<input type="checkbox"/>
↓ 100%エタノール1	室温	5分間	<input type="checkbox"/>
↓ 100%エタノール2	室温	5分間	<input type="checkbox"/>
↓ キシレンまたは代替剤1	室温	5分間	<input type="checkbox"/>
↓ キシレンまたは代替剤2	室温	5分間	<input type="checkbox"/>
↓			
封入 マリノールなど			<input type="checkbox"/>

8. 未固定凍結切片 / イムノポリマー法

処理	温度	時間	回数
未固定凍結切片			
↓			
固定 (以下のいずれか)			□
・4%PFA または 10%中性緩衝ホルマリン	室温	10分間	
・メタノール	室温	10分間	
・冷アセトン	4℃または-20℃	10分間	
メタノール、冷アセトンの場合は、固定後にドライヤーの冷風で5~10分間乾燥させる。			
↓			
PBS	室温	5分間	3回 □□□
↓			
0.3%過酸化水素 / メタノール	室温	30分間	□
↓			
TBS	室温	5分間	3回 □□□
↓			
ブロッキング G-Block (ジェノスタッフ社)	室温	10分間	□
↓			
TBS			□
↓			
一次抗体 1%G-Block/TBSで希釈	4℃	一晩	□
抗体濃度 <u>ug/mL (精製抗体) or 倍希釈 (抗血清)</u>			
<u>ug/mL (精製抗体) or 倍希釈 (抗血清)</u>			
<u>ug/mL (精製抗体) or 倍希釈 (抗血清)</u>			
↓			
TBS	室温	5分間	3回 □□□
↓			
二次抗体 ポリマー試薬 (シンプルステイン、EnVisionなど)	室温	30分間	□
↓			
TBS	室温	5分間	3回 □□□
↓			
DABで発色	室温	検鏡しながら停止。	□
↓			
流水	室温	10分間	□
↓			
G-DAPup (ジェノスタッフ社 #DCE-01)	室温	10分間	□
↓			
蒸留水で洗浄			□
↓			
ヘマトキシリン	室温	2~3秒	□
↓			
流水	室温	10分間	□
↓			
脱水系列			
↓ 70%エタノール	室温	5分間	□
↓ 90%エタノール	室温	5分間	□
↓ 100%エタノール1	室温	5分間	□
↓ 100%エタノール2	室温	5分間	□
↓ キシレンまたは代替剤1	室温	5分間	□
↓ キシレンまたは代替剤2	室温	5分間	□
↓			
封入 マリノールなど			□

9. 未固定凍結切片 / マウスonマウス（マウスの組織をマウス抗体で染色する方法）

処理	温度	時間	回数
未固定凍結切片			
↓			
固定（以下のいずれか）			□
・4%PFA または 10%中性緩衝ホルマリン	室温	10分間	
・メタノール	室温	10分間	
・冷アセトン	4℃または-20℃	10分間	
メタノール、冷アセトンの場合は、固定後にドライヤーの冷風で5~10分間乾燥させる。			
↓			
PBS	室温	5分間	3回 □□□
↓			
0.3%過酸化水素 / メタノール	室温	30分間	□
↓			
PBS	室温	5分間	3回 □□□
↓			
ブロッキング試薬A（ニチレイ マウスステインキット付属）	室温	1時間	□
↓			
PBS	室温	5分間	3回 □□□
↓			
一次抗体 1% G-Block/PBSで希釈	4℃	一晩	□
抗体濃度 <u>ug/mL (精製抗体) or 倍希釈 (抗血清)</u>			
<u>ug/mL (精製抗体) or 倍希釈 (抗血清)</u>			
<u>ug/mL (精製抗体) or 倍希釈 (抗血清)</u>			
↓			
PBS	室温	5分間	3回 □□□
↓			
ブロッキング試薬B（ニチレイ マウスステインキット付属）	室温	10分間	□
↓			
PBS	室温	5分間	3回 □□□
↓			
二次抗体 シンプルステインマウスMAX-PO(M)（キット付属）	室温	10分間	□
↓			
PBS	室温	5分間	3回 □□□
↓			
DABで発色	室温	検鏡しながら停止。	□
↓			
流水	室温	10分間	□
↓			
G-DAPup（ジェノスタッフ社 #DCE-01）	室温	10分間	□
↓			
蒸留水で洗浄			□
↓			
ヘマトキシリン	室温	2~3秒	□
↓			
流水	室温	10分間	□
↓			
脱水系列			
↓ 70%エタノール	室温	5分間	□
↓ 90%エタノール	室温	5分間	□
↓ 100%エタノール1	室温	5分間	□
↓ 100%エタノール2	室温	5分間	□
↓ キシレンまたは代替剤1	室温	5分間	□
↓ キシレンまたは代替剤2	室温	5分間	□
↓			
封入 マリノールなど			□