



10-minute IHC for Frozen Tissue: Step by Step Procedure

1) Fixation

- After frozen tissue is cut onto slides, immediately fix for **1 minute** in Novodix ihc Fixative or reagent grade acetone
(Alternative fixative solutions can be used based on user preference)
- Place slides to soak in wash buffer until ready to proceed

2) Blocker

- 1st wash (wash buffer) – Use spray bottle to wash tissue on the slides
- Wipe off excess wash buffer around the tissue with paper towel or Kim Wipe
- Apply blocker (covering entire tissue) and incubate for **1 minute**
DO NOT WASH OFF BLOCKER
- Hold slide vertical on a hard surface and tap off blocker onto a paper towel
- Wipe off excess blocker around the tissue with paper towel or Kim Wipe

3) Antibody

- Shake/mix antibody thoroughly before use
- Apply antibody (covering entire tissue) and incubate for **3 minutes**
- 2nd wash (wash buffer) – Use spray bottle to wash tissue on the slides
- Wipe off excess wash buffer around the tissue with paper towel or Kim Wipe

4) DAB

- Prepare DAB working solution (1 drop Chromogen to 1 ml Diluent) using provided supplies: **Before opening DAB chromogen shake or tap down fluid to the bottom of vial to ensure that it is not in the cap.**
- Use a plastic transfer pipette to dispense 1 ml of Diluent into an Eppendorf tube
- Use a plastic transfer pipette to dispense 1 drop (equal to 30 µl) of Chromogen
- Mix/invert well before use
- Apply DAB working solution (covering entire tissue) and incubate for **3 minutes**
- 3rd wash (DI or distilled water) -- Use spray bottle to wash tissue on the slides
- Wipe off excess water around the tissue with paper towel or Kim Wipe

5) Hematoxylin and Coverslip

- Apply Hematoxylin (by drop or soak) and incubate for a time range of **15 seconds up to 1 minute** (time depends on strength of user's Hematoxylin dye)
- 4th wash (DI or distilled water) – Use spray bottle to wash off Hematoxylin
- Wipe off excess water around the tissue with paper towel or Kim Wipe
- Apply mounting medium (aqueous or permanent) and Coverslip of user preference

Novodix Bulk Reagent Formulations:

1. ihc Fixative, (375ml of methyl alcohol, 100ml of 37% formaldehyde and 25ml of glacial acetic acid).

凍結切片での 10 分 IHC : ステップバイステッププロトコール

1) 固定

- 薄切した凍結切片をスライド上に乗せ、直ちに Novodiox ihc Fixative またはアセトン (試薬グレード) で 1 分間固定する (ユーザーの好みに基づいて代替の固定液も使用可能)
- 準備が整うまで洗浄バッファーにスライドを浸しておく

2) ブロッカー

- 1 回目の洗浄 (PBS-T) - スプレーボトルを使用してスライド上の組織を洗浄する
- ペーパータオルまたはキムワイプで組織周辺の余分な洗浄バッファーを拭き取る
- 切片全体を覆うようにブロッカーを滴下し、1 分間インキュベートする
ブロッカーを洗い流さない
- スライドを垂直にしっかりと持って作業台の上のペーパータオルにタップし、ブロッカーを落とす
- ペーパータオルまたはキムワイプで組織周りの余分なブロッカーを拭き取る

3) 抗体

- 使用前に抗体をしっかりと振り、混ぜる
- 切片全体を覆うように抗体を滴下し、3 分間インキュベートする
- 2 回目の洗浄 (PBS-T) - スプレーボトルを使用してスライド上の組織を洗浄する
- ペーパータオルまたはキムワイプで組織周りの余分な緩衝液を拭き取る

4) DAB

- DAB 反応液を作成する (1ml の希釈液に発色基質 1 滴) : DAB 基質は量が少ないため、蓋を開ける前にバイアルをタップまたは振り、蓋に DAB 基質が残らないようバイアルの底まで DAB 液を落とす
- マイクロチューブに希釈液 1 ml をピペット等で分注し、その中に DAB 基質液 1 滴 (30 μ l) を加える
- 使用前によく混合/攪拌する
- 切片全体を覆うように DAB 反応液を滴下し、3 分間インキュベートする
- 3 回目の洗浄 (DI または蒸留水) - スプレーボトルを使用してスライド上の組織を洗浄する
- ペーパータオルまたはキムワイプで組織周りの余分な水分を拭き取る

5) ヘマトキシリンおよび封入

- ヘマトキシリンを (滴下または浸漬して) 塗布し、15 秒~1 分間インキュベートする (時間は使用者のヘマトキシリン色素の強度に依存する)
- 4 回目の洗浄 (DI または蒸留水) - スプレーボトルを使用してヘマトキシリンを洗い流す
- ペーパータオルまたはキムワイプで組織の周りの余分な水分を拭き取る
- マウントメディア (水性等) とカバーガラスで封入する

参考

Novodiox ihc Fixative 組成: 375mL メチルアルコール、100mL 37%ホルムアルデヒド、25mL 氷酢酸



TANNER GROUP

日本ターナー株式会社

〒532-0003 大阪市淀川区宮原1-11-11

tel: 06-6393-4710(代) fax: 06-6393-4720

e-mail: support@japantanner.co.jp

Internet: www.japantanner.co.jp

201805