



IMMUNO SHOT immunostaining

An immuno-reaction enhancing solution for immunostaining

(#CSR-IS-SMF-10, #CSR-IS-S-20, #CSR-IS-M-20, #CSR-IS-F-20)

Instruction

(1) Introduction	2
(2) Products	2
(3) Characteristics of Compositions	2
(4) Method for paraffin sections	3
(5) Method for frozen sections	3
(6) Method for cultured cells	3
(7) Trouble shooting	4
(8) Related products	4
(9) Contact Information	4

Cautions

1. Research use only. Do not use for medical purpose.
2. Do not dilute or add other agents in IMMUNO SHOT Immunostaining to get the best result.
3. Solution F shows slightly yellowish color, and not due to denaturizing.

(1) Introduction

“IMMUNO SHOT Immunostaining” is the enhancer of antigen-antibody reaction designed for immunostaining, and enhances specific signal antigen-antibody while reducing non-specific background staining. Thus, you can get high S/N ratio. Simply exchange the dilution buffer of antibody to IMMUNO SHOT Immunostaining, then you can experience the observation with high S/N ratio. The product is produced based on the technology developed for IMMUNO SHOT which is an antigen-antibody reaction enhancer designed for Western Blotting and ELISA.

How IMMUNO SHOT Works ?

IMMUNO SHOT Immunostaining contains polymers and proteins. One of these agents by changing the physicochemical properties of antigen and antibody, enhances the mutual accessibility, and facilitate the specific reaction. The other ingredients reduces non-specific binding of antibody. Thus, IMMUNO SHOT Immunostaining enhances the antigen-antibody reaction while reduces background.

● Features of IMMUNO SHOT ●

1. Enhance specific signal while reducing background
IMMUNO SHOT Immunostaining enhances the specific antigen-antibody reaction, while reducing the non-specific binding . Thus, you can get much higher S/N ratio than usual method.
2. Can be used for many chromogenic reaction
IMMUNO SHOT Immunostaining does not affect activities of HRP (horse radish peroxidase) or ALP (alkaline phosphatase). IMMUNO SHOT Immunostaining can be also used with signal enhancing systems such as ABC system.
3. Easy to use
IMMUNO SHOT Immunostaining is formulated as to Ready to Use. Just exchange your antibody dilution buffer to IMMUNO SHOT Immunostaining.
(Caution: the signal enhancing effect of IMMUNO SHOT Immunostaining greatly depends on the nature of antibody and antigen, and you may not always get good results)

(2) Products

IMMUNO SHOT Immunostaining family has following products.

Product #	Composition	Content
CSR-IS-SMF-10	Set of Solutions F, M, and S	10 ml each
CSR-IS-F-20	Solution F	20ml
CSR-IS-M-20	Solution M	20 ml
CSR-IS-S-20	Solution S	20 ml

For beginner user, we recommend to purchase CSR-IS as the initial try

(3) Characteristics of Compositions

- Solution F:** The solution is designed to maximize the background-reducing activity. Ideal for observing fine structures by using antibodies with high specificity and sensitivity.
- Solution M:** The solution shows characteristics of middle of F and S. Ideal for initial try.
- Solution S:** The solution is designed to maximize the specific signal enhancing activity. Ideal for observing strong signal by using antibodies with less specificity and sensitivity. This solution has less ability to reduce background.

(Caution: the above description shows general characteristics of the solutions, and the results you get may be different depending on the antibody and antigen you are interested in.)

(4) Method for paraffin sections

As an example, staining using ABC system is described below. If recommended procedure after secondary antibody reaction is indicated by ABC kit supplier, please follow the recommended procedure.

- 1) Deparaffinize sections by xylene, and hydrate by using series of ethanol solutions.
- 2) Wash sections with DW for over 5 min.
- 3) Denature the endogenous peroxidase by using 0.3 to 1.0 % H₂O₂ solution.
- 4) Rinse the section with DW for 5min and incubate for 5min in PBS two times.
- 5) Coat entire tissue sections with blocking solution, and incubate for 30 minutes at room temperature in a humid chamber. There is no limitation of the species of blocking agents.
- 6) Dilute primary antibody by one of three solutions of IMMUNO SHOT Immunostaining to the concentration recommended by supplier.
- 7) After removal of blocking solution from sections, apply diluted primary antibody solution, and incubate for 1 hours at RT or overnight at 4°C in humid chamber. Incubation time varies from antibody to antibody.
- 8) Wash sections with PBS for 5min three times.
- 9) Dilute biotinized secondary antibody by one of three solutions of IMMUNO SHOT Immunostaining according to dilution factor recommended by supplier.
- 10) Apply diluted biotinized secondary antibody solution, and incubate for 30 min in humid chamber. Then, wash sections with PBS for 5min three times. (it is recommended to prepare avidin-biotin-peroxidase complex solution during this incubation time)
- 11) Apply the complex solution to the sections, and incubate for 30 min in humid chamber.
- 12) Wash sections with PBS for 5min three times, and incubate with chromatic substrate solutions.
- 13) Terminate reaction and mount the section using mounting medium. Observe by microscope.

(5) Method for frozen sections

For frozen sections, treat the section with the same manner as for paraffin sections except that treatment starts from 2) of above instructions. Be sure that the frozen sections are made from blocks of fixed samples and well dried. If sections are made from non-fixed samples, fix the sections with adequate fixative first and do the same procedure.

(6) Method for cultured cells

An example of cell staining using fluorescent-labeled secondary antibody is described.

- 1) Remove the culture medium and wash cultured cells once with PBS.
- 2) Fix cells for 30min with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer at RT.
- 3) Wash cells with PBS for 5min three times.
- 4) Add blocking solution, and incubate for 30 min at RT.
- 5) Wash cells with PBS for 5min three times.
- 6) Dilute primary antibody by one of three solutions of IMMUNO SHOT Immunostaining to the concentration recommended by supplier., and incubate for 1 hours at RT or overnight at 4°C in humid chamber.
- 7) Wash cells with PBS for 5min three times.
- 8) Dilute fluorescent dye-labeled secondary antibody by one of three solutions of IMMUNO SHOT Immunostaining to the concentration recommended by supplier, and incubate for 1 hours at RT.
- 9) Wash cells with PBS for 5min three times.
- 10) Observe the cells by fluorescent microscope.

(Caution: the addition of serum or protein into IMMUNO SHOT Immunostaining alters the nature of the reagent, and affects the efficacy of the reagent)

(7) Trouble shooting

Trouble	Cause and resolutions
Weak signals	1. Not enough antigens. Antigens may be lost after section preparation. Examine the fixative or fixation procedure
	2. Low antibody concentration. Examine the antibody concentration.
	3. Antigen masked. Liberate antigen by antigen retrieval procedures or agents.
	4. Blocking too strong. Strong blocking may reduce the signal. Examine the blocking condition and the species blocking agent.
	5. Too much washing. Examine the time and number of washings and the composition of washing solution especially detergent concentration..
High background or appearance of nonspecific staining	6. Antibody concentration too high. Excess antibody can enhance non-specific signal. Examine the antibody concentration.
	7. Endogenous peroxidase activity remaining. When using peroxidase for chromogenic reaction, endogenous peroxidase enhances nonspecific staining. Use longer denaturing time or strengthen the denaturing condition.
	8. Not enough blocking. Some antigen and antibody have preference of blocking agents, change the blocking agents or check the blocking conditions.
	9. Not enough washing. Increase the number or time of washing.
	10. Too long incubation with antibody. Reduce the antibody concentration or shorten the incubation time.


(8) Related products

- IMMUNO SHOT (#CSR-IS-001-250, #CSR-IS-002-250, #CSR-IS-012-250):

Antigen-antibody reaction enhancer for western blotting and ELISA.

- Easy-WESTERN:

A kit for primary antibody detection system designed for western blotting. The key component is MAD reagents which is a HRP-conjugated FC region-binding particle. The kit enables us, without using ordinary secondary antibody, much advantages, such as highly sensitive detection, multiple antigen detection, one-step detection and so on.

 COSMO BIO Co., LTD. [JAPAN] TOYO EKIMAE BLDG. 2-20, TOYO 2-CHOME, KOTO-KU. TOKYO 135-0016, JAPAN Phone: +81-3-5632-9610 FAX: +81-3-5632-9619 URL: https://www.cosmobio.co.jp/	 COSMO BIO USA [Outside Japan] 2792 Loker Ave West, Suite 101 Carlsbad, CA 92010, USA email: info@cosmobioussa.com Phone/FAX: (+1) 760-431-4600 URL: www.cosmobioussa.com
--	--

IMMUNO SHOT *immunostaining*

An immuno-reaction enhancing solution for
immunostaining

取扱説明書

(#IS-SMF-10, #IS-S-20, #IS-M-20, #IS-F-20)

---- 目 次 ----

(1) はじめに	2
(2) 構成試薬の特徴	2
(3) パラフィン切片の染色法	3
(4) 凍結切片の染色法	3
(5) 培養細胞の蛍光染色	3
(6) トラブルシューティング	4
(7) 姉妹品のご案内	4

ご注意

1. 本試薬は研究用試薬です。診断・臨床用試薬としては使用しないでください。
2. 本試薬は組成濃度が最適化されていますので、希釈やブロッキング剤の添加等を行うと本来の性能が出ない場合がありますので、ご注意ください。
3. Immuno shot immunostaining Fineは僅かに黄色が強くなっていますが、品質には問題ございません。

(1) はじめに

IMMUNO SHOT immunostaining は免疫組織染色、免疫細胞染色用に開発された抗原・抗体反応増強試薬です。免疫染色で問題となる染色不足や高いバックグラウンドを改善するための試薬で、普段お使いの手順の過程で、抗体の希釈液として利用するだけで簡単に特異的染色を強めることが出来ます。本製品は姉妹品である IMMUNO SHOT (ウェスタンブロッティングや ELISA 用) で培われた技術を元に、免疫染色用に特化した試薬として開発されました。

●本製品の特長●

1. 高い染色増強能・低いバックグラウンド

IMMUNO SHOT immunostaining は、免疫染色の染色不足を、抗原抗体反応を促進することによって改善します。また、バックグラウンドも低くなるように設計されていますので、高い S/N 比を得ることができます。

2. 高い汎用性

IMMUNO SHOT immunostaining は、種々の抗体へ利用可能で、FITC を始めとする蛍光標識、HRP やアルカリフォスファターゼなどの標識酵素の活性にも影響を与えませんので、これらを用いた検出系にも使用することができます。また、ABC 法等の増感システムと併用することも可能です。

3. 使用方法が容易

IMMUNO SHOT immunostaining の使用法は通常使用している抗体希釈液を本試薬へ代えるだけです。本試薬は濃度調整済ですので、希釈せずに使用してください。

(ご注意： 抗体の特性によっては本試薬の効果が十分得られない場合もあります)

(2) 構成試薬の特徴

IMMUNO SHOT immunostaining は実験目的ごとに適した試薬をお選び頂けます。

Fine : バックグラウンドをより低下させるように設計された組成です。微細構造観察に適しております。

Mild : Fine と Strong の中間の性質を有した組成です。初期検討を始め幅広い実験にご使用頂けます。

Strong : より強いシグナルを得るように設計された組成です。少しバックグラウンドが高くなる場合もございますが、良好なシグナルが得られます。

初めてご使用になられる場合には、Strong、Mild、Fine の 3 種のトライアルセット (品番：IS-SMF-10) のご購入をお勧めします。

ご注意：上記の各溶液の性質は、一般的な性質を示したものであり、用いる抗体の特性によって反応は異なります。

(3) パラフィン切片の免疫染色

使用参考例として 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。キットをご利用になる場合はキットの手順に従ってください。

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、その後エタノール系列を用いて水相に戻します。
2. 蒸留水で 5 分以上洗浄します。
3. 内在性ペルオキシダーゼを内在性ペルオキシダーゼ失活処理液で失活処理します。
4. 蒸留水で 5 分間洗浄し、PBS で 5 分間の洗浄を 2 回行います。
5. ブロッキング液を切片を覆う量を載せて加湿チャンバー内で 30 分以上ブロッキングします。ブロッキング液は普段お使いのものをご利用ください。
6. 一次抗体を IMMUNO SHOT immunostaining のいずれかの液で希釈し、切片を覆う量の一次抗体を載せて加湿チャンバー内で室温で 60 分もしくは、4℃で一晩反応させます。
7. PBS で 5 分間の洗浄を 3 回行います。
8. ビオチン標識二次抗体を 6. で使用した IMMUNO SHOT immunostaining で希釈し、切片を覆う量の二次抗体を載せて加湿チャンバー内にて室温で 30 分以上反応させます。この反応中、使用約 30 分前にアビジン-ビオチン複合体溶液を作っておきます。
9. PBS で 5 分間の洗浄を 3 回行います。
10. アビジン-ビオチン複合体溶液を切片が覆われる量を載せて加湿チャンバー内にて室温で 30 分間反応させます。
11. PBS で 5 分間の洗浄を 3 回行います。
12. 発色基質溶液を用いて発色させます。
13. 反応停止後、封入剤で封入し、顕微鏡で観察してください。

(4) 凍結切片の免疫染色

凍結切片の場合は切片の洗浄後、パラホルムアルデヒドなどで固定を行ってください。固定切片を PBS で洗浄した後はパラフィン切片の染色法の 3. 以降の手順を行ってください。

(5) 培養細胞の蛍光染色

培養細胞を直接固定し、蛍光染色する方法の一例をご紹介します。

1. ディッシュやプレートに培養した細胞から培地を除き PBS で一回洗浄します。
2. リン酸緩衝液で中性に調整した 4%パラホルムアルデヒド溶液を加え、室温で 30 分間固定します。
3. PBS で 5 分間の洗浄を 3 回行います。
4. ブロッキング液を加えて室温で 30 分間ブロッキングします。
5. PBS で 5 分間洗浄します。
6. 一次抗体を IMMUNO SHOT immunostaining のいずれかの液で希釈し、室温で 60 分以上もしくは、4℃で一晩反応させます。
7. PBS で 5 分間の洗浄を 3 回行います。
8. 蛍光標識した二次抗体を 6. で使用した IMMUNO SHOT immunostaining で希釈し、室温で 60 分間反応させます。
9. PBS で 5 分間の洗浄を 3 回行います。
10. PBS を適量入れた状態にて蛍光顕微鏡で観察してください。



ご注意：抗体の希釈液として希釈した FBS やタンパク質溶液などをご利用になる場合には、本試薬で希釈してすると増強効果が見られない場合がありますので、ご注意ください。

(6) トラブルシューティング

トラブル	原因と対策
シグナルが弱い	1. 抗原タンパク質が少ない。切片の薄切後抗原たんぱく質が流出している可能性があります。固定方法や固定までの手順を検討してください。
	2. 抗体濃度が低い。最適な抗体濃度を検討してください。
	3. 抗原たんぱく質がマスキングされている。抗原の賦活化処理を行ってください。
	4. ブロッキングが強すぎる。オーバーナイトなどでブロッキングを強くしすぎるとシグナルが弱くなる場合があります。また、ブロッキング液の種類や濃度も再検討してみてください。
	5. 洗浄が過剰。洗浄時間、回数、洗浄液の組成（界面活性剤濃度等）を検討してください。
バックグラウンドが高い、非特異的染色が生じる	6. 抗体濃度が高すぎる。過剰な抗体添加により、非特異的なシグナルが増大することがあります。最適な抗体濃度を検討してください。
	7. 内在性ペルオキシダーゼ活性の残存。ペルオキシダーゼ化学発色を用いる場合、失活処理の時間を長くするか、失活条件をより強いものにしてください。
	8. ブロッキングが不十分。抗原や抗体によっては、ブロッキング剤に大きく依存します。ブロッキング剤の種類、濃度やブロッキング時間の検討を行ってください。
	9. 洗浄が不十分。洗浄回数や洗浄時間を増やしてください。
	10. 抗体濃度が高い、或いはインキュベーション時間が長い。シグナルが見えるがバックグラウンドも高い場合、抗体濃度を低くするか、抗体との反応時間を短くしてください。

(7) 姉妹品のご案内

IMMUNO SHOT immunostaining の姉妹品として、ウェスタンブロットティングや ELISA 用に開発された IMMUNO SHOT もございます（品番：IS-012-250）。是非、ご利用ください。

 COSMO BIO Co., LTD.	 COSMO BIO USA
<p>【JAPAN】 TOYO EKIMAE BLDG. 2-20, TOYO 2-CHOME, KOTO-KU, TOKYO 135-0016, JAPAN Phone: +81-3-5632-9610 FAX: +81-3-5632-9619 URL: https://www.cosmobio.co.jp/</p>	<p>【Outside Japan】 2792 Loker Ave West, Suite 101 Carlsbad, CA 92010, USA email: info@cosmobiousa.com Phone/FAX: (+1) 760-431-4600 URL: www.cosmobiousa.com</p>