

細胞浮遊液ゼリー化試薬

iPGell[®]

(20 テスト)

《 取り扱い説明書 》

製品番号: PG20-1

ロット番号: 外箱(キットラベル)ならびに試薬チューブラベルに表示

製品説明: 培養細胞や血液細胞などの各種浮遊細胞のほか、3D培養の細胞や微小组織などを、ゼリー状に固めるキットです。

輸送と保管: 凍結(-20°C;ドライアイス)にて輸送

到着後、試薬(A-solution、B-solution)は速やかに冷凍保存(-20°C)

キットの構成: 試薬) A-solution 60 μ L/tube \times 4本 (各チューブ1回分の練習用を含む)

B-solution 300 μ L/tube \times 4本 (各チューブ1回分の練習用を含む)

付属品) サンプルチューブ 20 本

練習用サンプルチューブ 4 本

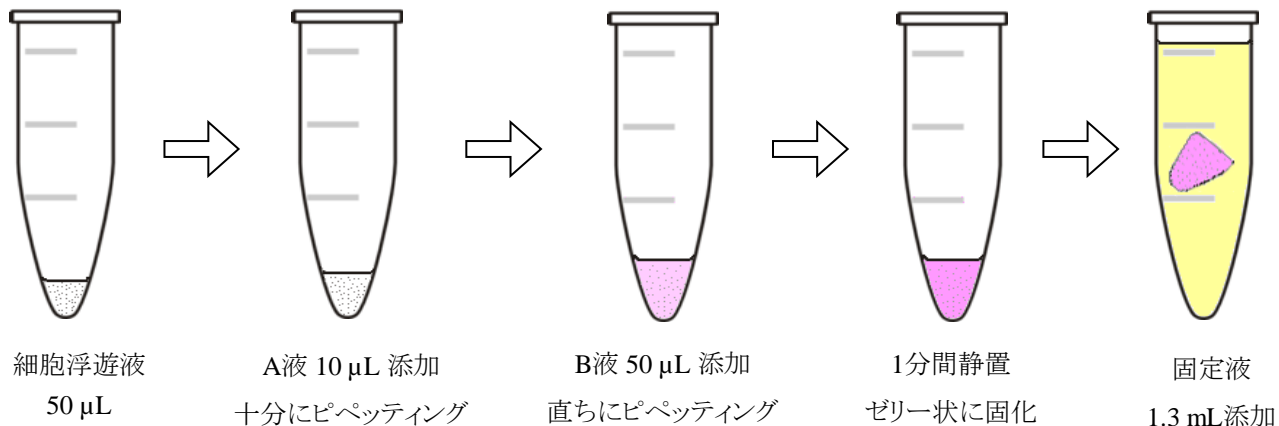
使用説明書(本書) 1 部

品質保証期限: 到着日より12ヶ月間

本製品の使用方法を動画でご覧になれますので、
弊社HP (<http://www.genostaff.com>) よりご確認ください

*** 使用方法 ***

<概略図>



実験前に、練習として培地などを使い溶液が固まる速度を確認してください

【培養細胞や血液細胞など分散している細胞の場合】

1. 試薬(A-solution、B-solution)を解凍し、A-solution は氷上、B-solution は室温に保持 ※1
2. 細胞浮遊液は遠心処理したのちに少量の培地 やバッファーなどで再懸濁し、氷上に保持 ※2,3
3. サンプルチューブに、A-solution 10 µL と細胞懸濁液 50 µL を加えて十分にピペッティング
4. 3のサンプルチューブにB-solution (赤色) 50 µLを加え、直ちに3回ピペッティング

○ 数秒で固まり始めますので、ピペッティングは速やかに行ってください。

○ 4回以上のピペッティングは避けてください。

ピペッティングを繰り返しますと、サンプルがチップ内でゼリー状に固まり始めてしまいます。

○ B液を入れた後はチューブを振ったり、タッピングやボルテックスなどで激しく攪拌しないでください。

○ ピペッティング中に泡が出来てしまった場合は、泡を無理に消そうとせず、そのままにしてください。

5. サンプルチューブを室温にて1分静置した後、チューブを逆さまにしてサンプルがゼリー状に固まったことを確認 (写真-①)
6. 固定液(10%中性緩衝ホルマリン、4%PFAなど) 1.3 mLを 加え、サンプルがチューブから剥がれるように軽くピペッティング (写真-②) ※4
7. 使用目的に適した固定を行い、組織ブロックを作製

※1. 試薬は37°Cにて速やかに解凍して下さい。解凍後は十分に攪拌してください。

固定液を入れた際にゼリーが見やすくなるように、B-solutionはフェノールレッドで赤色に着色しています。

保存状態・細胞浮遊液のpHによって黄色に変化する場合がありますが、品質に問題はありません。

B-solutionに澱のようなものが残った場合は、軽く遠心し上清をご使用ください。

※2. 再懸濁する際の細胞濃度の目安は、図-1を参照してください。

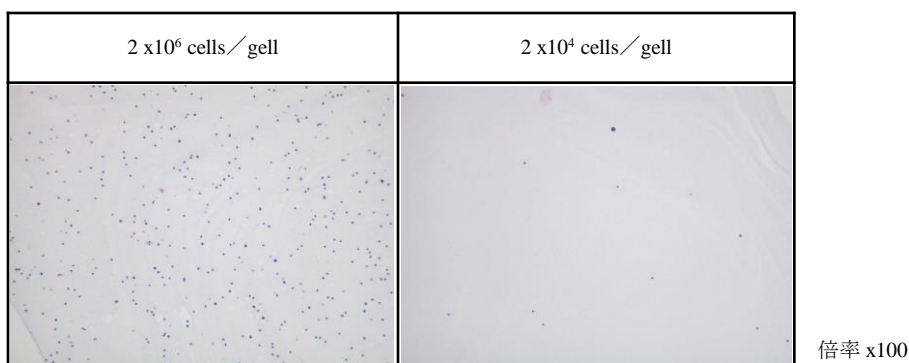
細胞を再懸濁する際の溶液には、培地(血清を含んでいても問題ありません)や中性pHのバッファーが適しています。

- ※3. 固定済みの細胞を使用する場合、固定液が残っていると上手く固まらないことがあります。
軽い遠心などで固定液を除いた後、**PBS**で洗浄し、培地または**PBS**などに再懸濁してください。
またゼリー状に固めた後は、再度固定液に浸漬してください。
- ※4. 固定液は、ブロック作製後の使用目的(**ISH**、免疫組織化学染色など)に応じて適切なものをご用意ください。
ISHの場合は、弊社の**ISH**用固定液(品番:**STF-01**)のご使用をお勧めいたします。
ゼリー状に固まったサンプルの赤色は、固定中に無色へと変化します。
本製品は、アセトン固定には適していません。

【微小組織や三次元培養細胞など細胞塊を維持するサンプル(例;胚様体)の場合】

サンプル溶液をピペッティングする際(工程3, 4)、組織構造・細胞塊の破壊を避けるために先端部をハサミ等で切り落として加工したチップをお使いください。(写真-③)

＜図-1 細胞濃度の目安＞



＜写真＞



ご使用上の注意

- ・ 解凍した試薬(A液、B液)はなるべく一度で使い切ってください。
試薬は必ず凍結保存し、凍結融解は2-3回にとどめてください。
凍結融解によってB液に澱のようなものが出る事があります。37°Cで温めても澱が消えない場合は使用を控えてください。
4°Cでの保存は固まらなくなる恐れがありますので避けてください。
- ・ 試薬を取り扱う際には、必ず手袋を着用してください。
- ・ 本製品は研究用です。 試験・研究用以外(医療品、食品、化粧品、家庭用品など)には使用しないでください。

○ iPGellで調製したサンプルをパラフィンブロックとして使用する場合

<パラフィンブロック作製手順>

1. iPGellを使用して細胞懸濁液のゼリーを作製し、固定液に浸漬(前ページ-使用方法参照)
2. チューブを軽く振盪しながら、1晩～1日間固定
3. PBSで洗浄 30分間
4. 70%エタノールに置換 30分間×2回
5. 定法に従い、パラフィン包埋(70%エタノール～)

- ※ ・70%エタノールに置換後、4°Cにて2-3日間は保存が可能ですが、できるだけ早めにパラフィン包埋してください。
- ・パラフィン包埋後、ゼリーの大きさは7-8割に縮みます。
- ・染色方法によっては切片上のゼリー部分に色がつく場合があります。

～パラフィン包埋の例(ロータリー式自動包埋機を使用)～

- | | |
|------------------------------|---------------------|
| 1. 70%エタノール 室温 1時間 | 8. キシレン1 室温 1時間 |
| 2. 80%エタノール 室温 1時間 | 9. キシレン2 室温 1時間 |
| 3. 90%エタノール 室温 1時間 | 10. キシレン3 室温 1時間 |
| 4. 100%エタノール1 室温 1時間 | 11. パラフィン1 65°C 1時間 |
| 5. 100%エタノール2 室温 1時間 | 12. パラフィン2 65°C 1時間 |
| 6. 100%エタノール3 室温 1時間 | 13. パラフィン3 65°C 1時間 |
| 7. 100%エタノール/キシレン 1:1 室温 1時間 | |



ご使用上の注意

iPGellで固めたサンプルをパラフィン包埋する際に、加圧や減圧を伴う包埋機をご使用されますと、組織が変形する可能性があります。ロータリー式の包埋機のご使用をお奨めいたします。

○ iPGellで調製したサンプルを既固定凍結ブロックとして使用する場合

<既固定凍結ブロック作製手順>

1. iPGellを使用して細胞懸濁液のゼリーを作製(前ページ-使用方法参照)
2. 4%PFA/PBSを添加して1時間～1晩固定※1
3. PBSでリンスした後、新しいPBSに変えて30分間洗浄
4. ゼリーをカセット等に移し、シュークロース置換 (4°C) ※2
 - 4-1. 10% sucrose/PBS 2～4時間
 - 4-2. 20% sucrose/PBS 2時間～1晩
 - 4-3. 30% sucrose/PBS 2時間～1晩
5. 置換完了後、キムタオル上でゼリーを転がし、周囲についた水分を軽く取り除く ※3
6. コンパウンド中に軽くなじませ、そのまま15分間浸漬
7. クライオモールドに新しいコンパウンドを入れ、6のゼリーを包埋
8. ドライアイス・ヘキサンなどで急速凍結 ※4

- ※1. 免疫組織化学染色を目的とする場合は、ご使用の抗体に適した時間で固定してください。
固定中は振盪機などでチューブ内の固定液を緩やかに攪拌して下さい。
顆粒細胞を扱う場合、細胞が壊れやすいため固定を一晩行ってください。
- ※2. シュークロス置換は、ゼリーをチューブから取り出し容量の大きい別の容器に移して行ってください。
シュークロス中ではゼリーが沈みにくいため、カセットに入れる、もしくはキムワイプなどで押さえて、サンプルを液中に沈めた状態で置換を行ってください(写真-④、⑤)。
固定液が残存していると染色性に影響する可能性がありますので、シュークロス置換には十分な時間をとってください。
- ※3. ゼリーが乾燥しないように注意してください。
- ※4. 液体窒素を使用される場合は、サンプルにヒビが入りやすいのでご注意ください。

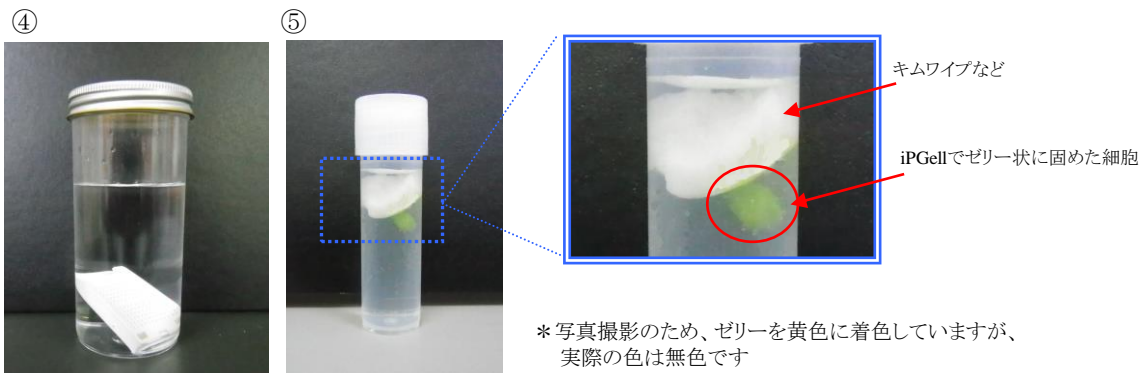
既固定凍結切片作製時のご注意

- ・既固定凍結ブロックでは、ブロック中のゼリー(サンプル)が非常に見え難くなります。
- ・薄切は-25°C前後から調整してください。温度が高いとゼリー部分がナイフについてしまい、切片にならない事があります。
- ・切片のゼリー(サンプル)部分は非常に破れやすいため取り扱いにご注意ください。
- ・切片作製には剥離防止処理済スライドガラスをご使用ください。
以下のスライドガラスのご使用をお勧めいたします。
*武藤化学 ポリ-L-リジンコート、マツナミガラス APSコートなど
- ・冷却したスライドガラスに切片を貼り付けると、ゼリー部分がスライド上で収縮する場合があります。
収縮に伴い、微小組織や3次元培養細胞などでは組織が変形する可能性があります。
切片を貼り付ける際は常温のスライドガラスをご使用ください。
スライドの種類、ロットによってはゼリー部分の収縮が大きいものもあります。
- ・凍結ブロックは-80°Cで保管してください。
-80°C~-20°C間の温度変化を繰り返しますと、ブロックが劣化し薄切が出来なくなる可能性があります。
-80°C庫からの出し入れ、薄切は最小限にしてください。
- ・染色法によっては切片上のゼリー部分に色がつく場合があります。
必要に応じて染色前にテストを行いご確認ください。



本製品は未固定凍結切片には適応しておりません

<写真>



iPGell FAQ

Q. シャーレで培養している状態のまま固めることは可能ですか？

A. シャーレで培養中のまま固めることは出来ません。

浮遊液の状態にしていただき、規定量を付属のサンプルチューブに採って、チューブの中で固めて下さい。また本製品は、浮遊液の状態をそのままゼリー状に固めるものなので、少ない細胞数のサンプルに対して使用することで、細胞を集約できるものではございません。

Q. どの程度の大きさ(上限)のサンプルまで使えますか？

A. 培養細胞や胚様体(約0.2 mm)など、組織ブロックにするのが困難だった極微小なサンプルをゼリー中に閉じ込めて、一般組織と同様に扱いブロックにするのを目的とした製品です。従いまして、解剖で摘出可能な大きさの組織などは、本製品の使用には適しておりません。

Q. iPGell で固めたサンプルはそのままでどの程度保存できますか？

A. 本製品はサンプルを保存することを目的とした製品ではございません。

従いまして、ゼリー状に固めた後は直ちに固定を開始して下さい。

浮遊液をゼリー状に固める操作から固定開始までを、非加熱かつ迅速に行なえることで、細胞を生きたままに近い状態で固定することができるので、RNAやタンパク質の分解・変性が少ない状態で固定されます。

なお、パラフィンブロック作製後は長期間の保存が可能です。

Q. ゼリー中の細胞は生きていますか？

A. 本製品を用いますと、浮遊液の状態から1～2分間に固定を開始する事が出来ますので、その処理の間は生きていますと考えられます。しかし、ゼリー状に固めた後、直ちに固定を開始することを前提とした製品ですので、どの程度の時間生きていたかの検証はしておりません。

Q. 既に固定した細胞を固めることは可能ですか？

A. はい、可能です。

ですが固定液が残っていたり、サンプルが固定液中に浮遊した状態ですと、上手くゼリー状に固まらない場合がございます。従いまして、軽い遠心や自沈後に固定液を除いて、PBSなどで洗浄していただき、最終的にPBSや培地に再浮遊させた状態で、本製品をご使用下さい。また、サンプルをゼリー状に固めた後は、再度固定液に浸漬して下さい。

Q. ゼリー状に固めたサンプルを溶かして取り出せますか？

A. 本製品の特性上、1度固めたサンプルを溶かすことは出来ません。

- 弊社では、iPGellにて調製されたサンプルにつきまして、下記受託サービスを承ります。

《受託サービス内容》

- ・ パラフィンブロックおよび既固定凍結ブロックの作製
- ・ パラフィン切片および既固定凍結切片の作製
- ・ in situ Hybridization
- ・ 免疫組織化学染色
- ・ 各種特殊染色

- 各種受託サービスをご利用の際には、下記までご連絡ください。ご希望により、サンプル返送用セット(無料)をお送りいたします。

《お問い合わせ先》

E-mail : ipgell@genostaff.com (iPGell 専用アドレス)

電話 : (03) 5615-8857

本製品の取り扱いなどに関するご質問につきましても、
上記お問い合わせ先までお願いいたします

製造発売元

ジェノスタッフ 株式会社
〒113-0032 東京都文京区弥生2-5-8 GSビル
電話 (03) 5615-8857 FAX (03) 5615-8858