

～スライド塗抹標本作製キット～

Smear Gell[®]

《 取り扱い説明書 》

～本製品をご使用になる前にお読みください～



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。

実験前に、必ず操作方法(ゼリーの塗り広げ方)を

弊社HP (<http://www.genostaff.com>) より動画にて確認してください

キットの試薬には、各チューブにスライド2枚分の練習用予備が含まれています
初めに練習として、予備スライドを作製し、溶液が固まる速度、塗抹方法を確認してください
練習用には、細胞浮遊液の培地やバッファーと同じものをご使用ください

§ 1.	準備	Page 1-2
§ 2.	スライド標本の作製	Page 3-4
§ 3.	染色	Page 5-6

§ 1. 準備

1. 試料

1) 細胞浮遊液は遠心処理したのち、少量の培地 やバッファーなどで再懸濁してください。

- * 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。
- * 固定済みの細胞を使用する場合は、軽く遠心処理して固定液を除き、PBSで洗浄したのちに培地やバッファーで再懸濁してください。固定液が残っていると、ゼリーが上手く固まらないことがあります。ゼリー状に固めた後は、スライドごと再度固定を行ってください。
- * セルバンカーやグリセリンなどの細胞凍結保護剤を含む場合も、PBSで洗浄して培地やバッファーに再懸濁してください。凍結保護剤が含まれていてもゼリー状に固まりますが、固定以降の操作で剥れが生じます。
- * 細胞の種類によっては、染色中にバーストがおこりやすいのでご注意ください。
マストセルを使用される場合は、固定済みの細胞をご使用いただくか、ゼリー状に固めた後の固定を長めに行ってください。§ 3.染色-HE染色および免疫細胞化学染色の注意事項をご確認ください。
- * 血球系細胞の観察に血液(全血)を使用される場合は、培地もしくは生理食塩水で100倍程度に希釈してご使用ください。収縮が起きるため、赤血球の観察には向いていません。

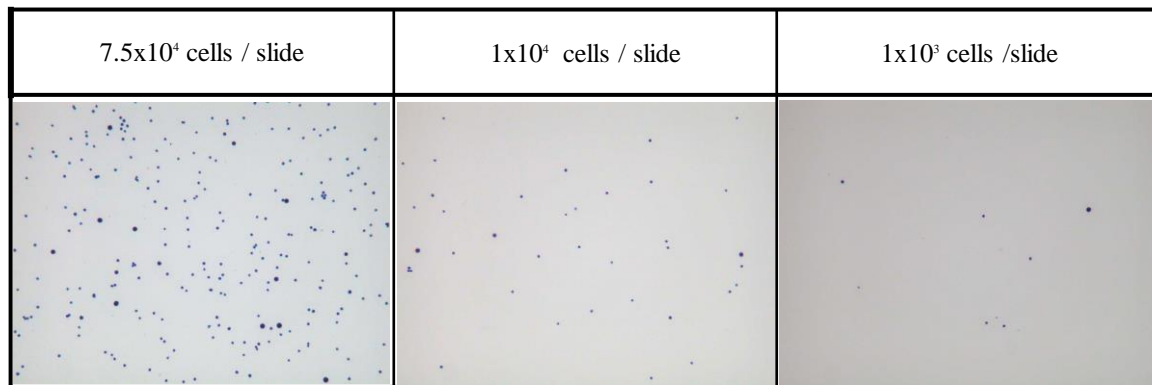
2) スライド1枚につき、3 μ Lの細胞懸濁液を用意してください。

2. 試薬

1) Smear Gellの試薬(1液、2液)を解凍して室温に保持してください。

- * 試薬は37°Cにて速やかに解凍し、軽く遠心して蓋についた試薬を落としてください。
使用前には十分に攪拌してください。
解凍した試薬(1液、2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2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。

<図-1 細胞濃度の目安 >



血球系細胞 対物レンズ100倍

- * スライドに塗ったゼリーの厚さ、観察する場所によって、細胞の密度は異なります。
写真は塗抹したGellの中央付近の像です。

3. その他

- 手袋

- * 試薬を取り扱う際には、必ず手袋を着用してください。

- マイクロピペット

- マイクロピペット用チップ

- * Smear Gellを塗り広げる際、図-2のように、チップの先端をナイフなどで斜めに切り落とすと使いやすくなります。

- マイクロチューブ

- 剥離防止処理済みスライドガラス (マツナミガラスAPSコート)

- * APSコート以外のスライドガラスでは、Smear Gellを塗り広げる際にコーティング剤が剥れてゼリー内にゴミが生じ、観察に影響することがあります。

- PBS

- * 必要に応じてご準備ください。

- 固定液

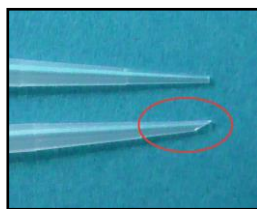
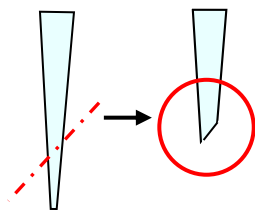
- * Smear Gellを塗り広げた後、スライドごと固定するときに使用します。

- * 目的(免疫細胞化学染色、特殊染色など)に応じて適切なものをご準備ください。

- ただし、本製品はアセトン固定には適していません。

<図-2 チップ>

Smear Gellを塗り広げる際に使用するチップは、ナイフ等で先端を図のように斜めに切り落とすと使いやすくなります

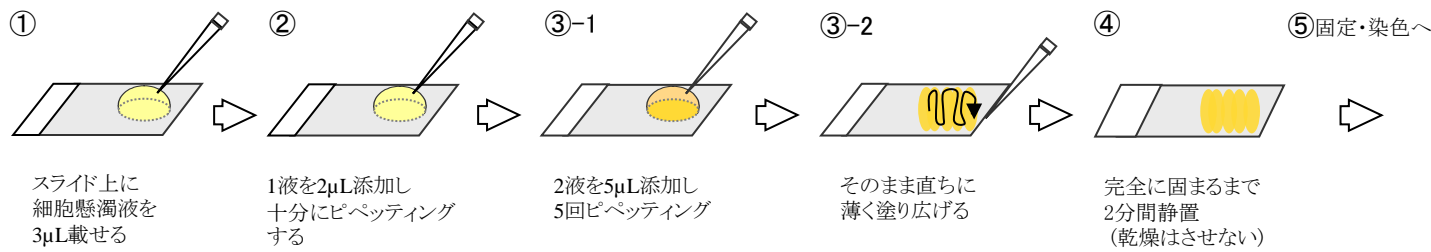


先端を切り落としたチップ
(切断面の面積が広がるようにしてください)

§ 2. スライド標本の作製

操作方法の詳細は、弊社HP (<http://www.genostaff.com>) より動画をご確認ください

<概略図>



【操作手順】

1. スライド上に細胞懸濁液を3 μ L載せます。
2. 1液を2 μ L添加し、十分にピペッティングします。
3. 2液を5 μ L加えて直ちに5回ピペッティングし、図-3のようにそのままチップを寝かせるように傾けて一気に塗り広げます。

* スライド上で試薬を混合すると数秒で固まりますので、5回以上のピペッティングは避け、速やかに塗抹操作を行ってください。塗り広げている途中でゼリーが固まると、ムラや剥れの原因になりますのでご注意ください。

* ピペッティング中にできてしまった泡は無理に消そうとせず、そのままにしてください。

* 塗抹操作は、2cm \times 1cmの範囲内で5回程度を目安にチップを往復させると、程よい厚さに塗り広げられます。ゼリーが乾いてしまうため、無理に薄く広げないでください。

* Smear Gellを塗り広げる際、図-2のようにチップの先端をナイフなどで斜めに切り落とすと使いやすくなります。

4. 2分間静置し、ゼリーを固めてください。乾燥はさけてください。

* 塗抹後すぐにスライドを傾けると、ムラが生じますので、ゼリーが固まるまで静置してください。

* 2分以上静置しないでください。ゼリーが乾燥してしまい、細胞の形態に影響が及ぶことがあります。

通常の操作でもゼリーの縁が多少乾くことがありますので、その部分は観察の対象から除外してください。

5. スライドごと固定液に漬けて固定を行ってください。

* 固定条件(固定液の種類、固定時間など)は、「§ 3. 染色」の項に掲載されている内容を参考に、目的(免疫細胞化学染色、特殊染色など)に応じて適切に決定してください。

* 顆粒系の細胞を扱う場合、細胞が壊れやすいため固定時間を長めに設定してください。

<表-1 スライド作製枚数とサンプル調製量>

		スライド作製枚数				
		1枚	2枚	3枚	5枚	10枚
混合液として使用	細胞懸濁液	3 μ L	6 μ L	9 μ L	15 μ L	30 μ L
	1液	2 μ L	4 μ L	6 μ L	10 μ L	20 μ L

*2液はスライド1枚あたり5 μ Lを使用します

- 同一サンプルの標本を複数作製する場合 -

同一サンプルの標本を複数作製する場合は、事前に細胞懸濁液と1液をマイクロチューブ内で混合しておくとお操作が簡便です。

【操作手順】

1. マイクロチューブ内で細胞懸濁液に1液を加えて十分にピペッティングし、混合液を作ります。

*細胞懸濁液と1液を混合する際の容量は、左ページ表-1を参照してください。

2. スライド上に2液を5 μL 載せます。

3. スライド上の2液に、先に調製した混合液5 μL を加えて直ちに5回ピペッティングし、図-3のようにそのままチップを寝かせるように傾けて一気に塗り広げます。

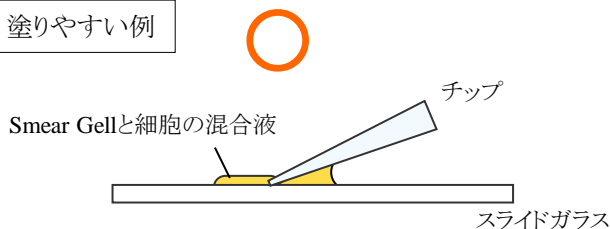
*以降の操作は左ページの操作手順4～に従ってください。

<図-3 塗抹の方法>

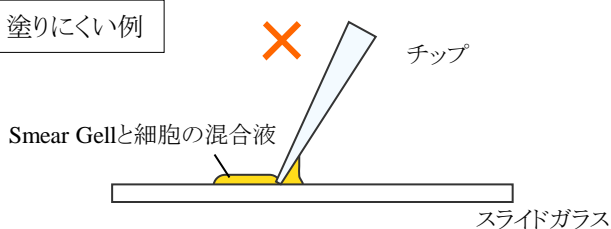
《横から見た図》

チップの先端を寝かせるように傾けた状態で塗り広げてください。起こしたままだとうまく塗り広げられません。

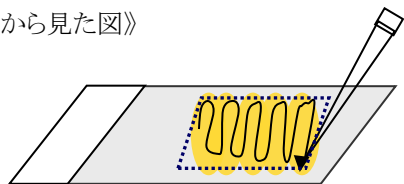
塗りやすい例



塗りにくい例



《上から見た図》



2cm×1cmの範囲内で5回を目安にチップをジグザグに往復させると、程よい厚さに塗り広げられます。

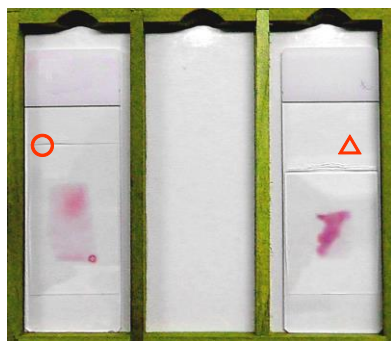
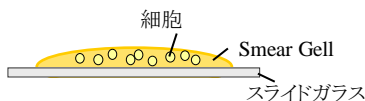
塗りなおしはせず、5往復を目安に塗りきってください。

ゼリーが乾いてしまうため、無理に薄く延ばさないでください。

<図-4 標本の作製例>



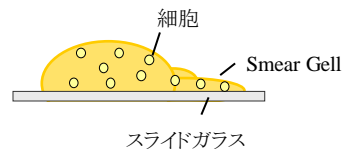
ムラが少なく程よい厚さで塗れています。細胞がほぼ単層に近く、観察しやすい標本です。



標本作製後、HE染色



ムラが多いため剥れやすくなります。Gellに厚みがあり、細胞の固まっている高さがばらつきがあるため、観察しにくいことがあります。



§3. 染色

- ギムザ染色 -

～ 武藤化学 ライト・ギムザ染色液(1502)を使用した場合の染色例 ※～

1. 操作手順1～5に従い、Smear Gellスライド標本を作製

2. 100%メタノールで30分間固定

*メタノール固定後のスライドはバッファー等には通さず、そのままギムザ染色を行ってください。

3. ライト・ギムザ染色液をスライドにかけ(0.5mL/slide)、40秒間染色

4. 1/15mol/L リン酸緩衝液(pH6.4)を0.5mL (ギムザ染色液と等量) かけ、6分間染色

*リン酸緩衝液がスライド全体に行き渡るように、軽く振とうしてください。

5. 蒸留水で染色液を軽く水洗

6. 新しい蒸留水に漬けて5分～10分間洗浄

*色素の浮きカスがゲルに付着しやすいため、水洗を行ってください。

多少の残りカスは、その後のアルコール系列で除去されます。蒸留水中に長時間浸漬すると、脱色が進むため、途中で細胞の色合いを確認してください。

7. 脱水、分別

(70%エタノール→90%エタノール→100%エタノール×2 :それぞれスライドを5-6回上下させる)

*染色像を観察しやすくするため、アルコール系列による分別、脱水を行ってください。(図-5参照)

手順5の時点で染色細胞自体が多少濃く染まっても、このアルコール系列で脱色されます。

アルコール系列に長めに漬けると、脱色が進みすぎますのでご注意ください。

Smear Gellの厚みにムラがある場合、厚みのある部分の脱水に時間がかかりますので、脱水～透徹の際にご注意ください。

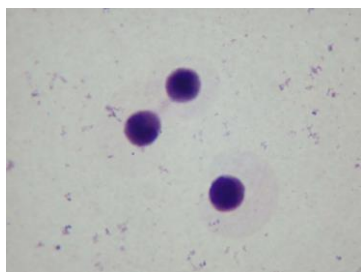
6. 透徹 (キシレン)

7. 封入

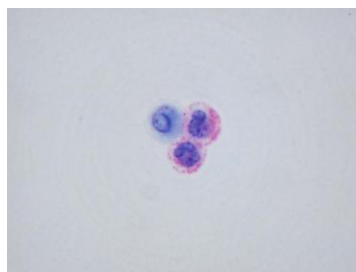
※メイ・グリーンワルドギムザ染色や他のギムザ染色液を使用する場合は、染色工程3-6をアレンジして、染色時間をそれぞれご検討ください。

本製品で作製した標本は通常の塗抹標本に比べ染色されやすいため、各染色液の時間を短縮し、様子を見ながら色を調整してください。半分程度の時間から調整することをお勧めします。

<図-5 アルコール系列での分別の有無による染色像の違い>



水洗→風乾→キシレン、封入



水洗→アルコール系列で分別・脱水
→キシレン、封入

- HE染色 -

1. 操作手順1～5に従い、Smear Gellスライド標本を作製

2. 10% 中性緩衝ホルマリンで30分間固定

* 固定時間は15分間程度でも可能ですが、マストセルのように壊れやすい細胞の場合は30分間以上の固定を行ってください。メタノール固定ではゲルが斑点状に染まることがありますのでご注意ください。

3. PBSで洗浄

4. ヘマトキシリン染色

* 本製品で作製した標本は組織切片に比べ染色されやすいため、各染色液の時間を短縮し、様子を見ながら色を調整してください。特にヘマトキシリン染色は組織切片の1/10程度の時間から調整することをお勧めします。

5. 流水で水洗

6. エオジン染色

* ゼリーはエオジンで着色されます。観察に大きな影響はありませんが、ゼリーに厚みのある部分では赤色が目立つ場合があります。

7. アルコール系列で分別、脱水

8. 透徹 (キシレン)

9. 封入

- 免疫細胞化学染色 -

1. 操作手順1～5に従い、Smear Gellを作製

2. 4%PFA、10% 中性緩衝ホルマリン等で30分間固定

3. PBSで洗浄

4. 免疫細胞化学染色

* 固定方法(固定液、固定時間など)は使用する抗体に適した条件を選択してください。

本製品はアセトン固定には適していません。

マストセルのように壊れやすい細胞の場合は10% 中性緩衝ホルマリンで30分間以上の固定を行ってください。

* 染色はチャンバースライドや凍結切片でのプロトコール等を参考に、至適条件の検討を行ってください。

* 壊れやすい細胞について、内因性ペルオキシダーゼのブロッキングを行う場合、0.3%過酸化水素加メタノールの代わりに、0.3%過酸化水素加PBSや3%過酸化水素加PBS等をご検討ください

* 必要に応じて膜透過処理(メタノール、界面活性剤等)を行ってください。

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

《お問い合わせ先》

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

電話 : (03) 5615-8857

2105

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
ホームページアドレス <http://www.genostaff.com>