

抗 PD-L1 抗体 [clone 28-8] 自動免疫組織染色装置別 プロトコール

PD-L1 RabMAb[®] [clone 28-8] (ab205921)

- BioGenex 社 i6000 (オフライン抗原賦活化)
- Leica 社 BOND RX (オンライン抗原賦活化)
- Ventana 社 Ultra (オフライン抗原賦活化)
- Dako 社 Omnis

BioGenex 社 i6000 プロトコール (オフライン抗原賦活化)

試薬

- ・ キシレン (EM Science 社 カタログ番号 UN1307)
- ・ エタノール (AAPER alcohol and Chemical 社)
- ・ IHC Wash Buffer (DAKO 社 カタログ番号 S3006)
- ・ Target Retrieval Solution AR6 (DAKO 社 カタログ番号 S1699)
- ・ Novolink Max Polymer Detection System (Leica 社 カタログ番号 RE7260-CE)
- ・ Peroxidase block (DAKO 社 カタログ番号 S2003)
- ・ Protein block (DAKO 社 カタログ番号 X0909)
- ・ Common antibody Diluent (BioGenex 社 カタログ番号 HK156-5K)
- ・ DAB chromogen substrate (DAKO 社 カタログ番号 K3468)
- ・ Cytoseal mounting medium (Richard-Allen Scientific 社)
- ・ 抗 PD-L1 ウサギ・モノクローナル抗体 RabMAb[®] [28-8] (アブカム カタログ番号 ab205921、使用濃度 2 µg/mL)
- ・ ウサギ・モノクローナル・アイソタイプコントロール抗体 (アブカム カタログ番号 ab172730、使用濃度 2 µg/mL)

機器

- ・ BioGenex 社 i6000 Autostainer
- ・ Leica 社 multistainer ST5020 (脱パラフィン、再水和、脱水に使用)
- ・ BioCare Medical 社 Decloaking Chamber[™] Plus (抗原賦活化に使用)
- ・ Leica 社 Auto Coverslipper CV5030 (封入に使用)

抗原賦活処理

1. 脱パラフィンおよび再水和 - スライドを Leica 社 ST5020 内で以下の順番に処理する：キシレン (5分 x 2回)、100%エタノール (2分 x 2回)、95%エタノール (2分 x 2回)、70%エタノール (2分 x 2回)、蒸留水 (dH₂O ; 2分)。
2. 抗原賦活処理 - スライドを DAKO 社 AR6 Target Retrieval Solution に浸し、BioCare Medical 社 Decloaking Chamber[™] Plus を次のセッティングで処理する。P1 - 110℃、10分、P2 FAN ON - 95℃、P2 FAN OFF - 90℃。
3. スライドを室温で 15 分間空冷し、dH₂O でリンスする (およそ 1 分間)

免疫染色

1. スライドを BioGenex i6000 Autostainer にセットする。
2. スライドに Peroxidase Block を滴下し、室温で 10 分間反応させる。
3. スライドを IHC wash buffer で 3 回洗浄する。
4. スライドに Protein Block を滴下し、室温で 20 分間反応させる。
5. スライドを IHC wash buffer で 3 回洗浄する。
6. スライドに希釈調整した一次抗体を滴下し、室温で 1 時間反応させる。
7. スライドを IHC wash buffer で 3 回洗浄する。
8. スライドに Novolink Max Polymer Detection System 内の Post Primary Block を滴下し、室温で 30 分間反応させる。
9. スライドを IHC wash buffer で 3 回洗浄する。
10. スライドに Novolink Max Polymer Detection System 内の NovoLink Polymer を滴下し、室温で 45 分間反応させる。
11. スライドを IHC wash buffer で 3 回リンスする。
12. スライドに用事調整した DAB chromogen substrate 溶液を滴下し、室温で 5 分間染色する。

13. スライドを dH₂O で 5 回洗浄する（室温）。
14. スライドに Hematoxylin 溶液を滴下し、室温で 1 分間対比染色を行なう。
15. スライドを dH₂O で 5 回リンス洗浄する（室温）。

脱水と封入

1. BioGenex 社 i6000 からスライドを取り出す。
2. スライドを Leica 社 ST5020 にセットする。
3. 脱水 - スライドを以下の順番で処理する；70%エタノール（1 回、2 分間）、95%エタノール（1 回、2 分間）、100%エタノール（3 回、各 2 分間）
4. スライドをキシレンで 3 回、各 2 分間洗浄する。
5. スライドを Leica 社 Auto Coverslipper CV5030 を使用し、Cytoseal Mounting Medium を用いて封入する。

Leica 社 BOND RX プロトコール (オンライン抗原賦活化)

試薬

- Bond™ Dewax Solution (Leica 社 カタログ番号 AR9222)
- Bond™ Epitope Retrieval 1 (Leica 社 カタログ番号 AR9961)
- Bond™ Wash Solution (Leica 社 カタログ番号 AR9590)
- Bond™ Polymer Refine Detection kit (Leica 社 カタログ番号 DS9800)
- Common Antibody Diluent (BioGenex 社 カタログ番号 HK156-5K)
- Cytoseal mounting medium (Richard-Allen Scientific 社)
- 抗 PD-L1 ウサギ・モノクローナル抗体 RabMAb® [28-8] (アブカム カタログ番号 ab205921、使用濃度 2 µg/mL)
- ウサギ・モノクローナル・アイソタイプコントロール抗体 (アブカム カタログ番号 ab172730、使用濃度 2 µg/mL)

機器

- Leica 社 BOND RX 自動免疫染色装置
- Leica 社 multistainer ST5020 (脱パラフィン、再水和、脱水に使用)
- Leica 社 Auto Coverslipper CV5030 (封入に使用)

抗原賦活処理および免疫染色

1. スライドを Leica 社 BOND RX にセットし、過熱して脱パラフィン処理する。
2. スライドを Bond™ Epitope Retrieval 1 (クエン酸バッファー、pH6) に浸し、100℃で 30 分間抗原賦活処理する。
3. スライドに Bond™ Polymer Refine Detection kit 内の Peroxidase block を滴下し、室温で 10 分間反応させる。
4. スライドを Bond™ Wash Solution を用いて 3 回リンスする。
5. スライドに希釈調整した一次抗体を滴下し、室温で 1 時間反応させる。
6. スライドを Bond™ Wash Solution を用いて 3 回洗浄する。
7. スライドに Bond™ Polymer Refine Detection kit 内の Post Primary Block を滴下し、室温で 30 分間反応させる。
8. スライドを Bond™ Wash Solution を用いて 3 回洗浄する。
9. スライドに Bond™ Polymer Refine Detection kit 内の NovoLink Polymer を滴下し、室温で 30 分間反応させる。
10. スライドを Bond™ Wash Solution を用いて 3 回洗浄する。
11. スライドに Bond™ Polymer Refine Detection kit 内の DAB chromogen substrates を滴下し、室温で 10 分間染色する。
12. スライドを dH₂O で 5 回リンス洗浄する (室温)。
13. スライドに Bond™ Polymer Refine Detection kit 内の Hematoxylin 溶液を滴下し、室温で 8 分間対比染色を行なう。
14. スライドを dH₂O で 5 回リンス洗浄する (室温)。

脱水と封入

1. Leica 社 BOND RX からスライドを取り出す。
2. スライドを Leica 社 ST5020 にセットする。
3. 脱水 - スライドを以下の順番で処理する ; 70%エタノール (1 回、2 分間)、95%エタノール (1 回、2 分間)、100%エタノール (2 回、各 2 分間)
4. スライドをキシレンで 2 回、各 2 分間洗浄する。
5. スライドを Leica 社 Auto Coverslipper CV5030 を使用し、Cytoseal Mounting Medium を用いて封入する。

Ventana 社 Ultra プロトコール (オンライン抗原賦活化)

試薬

- ・ キシレン (EM Science 社 カタログ番号 UN1307)
- ・ エタノール (AAPER alcohol and Chemical 社)
- ・ Universal HIER antigen retrieval reagent (アブカム カタログ番号 ab208572)
- ・ Antibody Diluent (アブカム カタログ番号 ab64211)
- ・ ChromoMap DAB kit (Ventana 社 カタログ番号 760-159)
- ・ Cytoseal mounting medium (Richard-Allen Scientific 社)
- ・ Anti-Rabbit HQ (Ventana 社 カタログ番号 760-4815)
- ・ Anti-HQ HRP (Ventana 社 カタログ番号 760-4820)
- ・ Hematoxylin II (Ventana 社 カタログ番号 790-2208)
- ・ Bluing Reagent (Ventana 社 カタログ番号 760-2037)
- ・ 抗 PD-L1 ウサギ・モノクローナル抗体 RabMAb® [28-8] (アブカム カタログ番号 ab205921、使用濃度 7.5 µg/mL)

機器

- ・ Ventana 社 Ultra
- ・ Leica 社 ST5020 Multistainer (脱パラフィン、脱水に使用)
- ・ BioCare Medical 社 Decloaking Chamber™ Plus (抗原賦活に使用)

免疫染色

1. Leica 社 ST5020 Multistainer を用いて予熱および脱パラフィン処理を以下の手順で行なう。
 - a. スライドをセットし、65℃で 10 分間予熱する。
 - b. スライドをキシレンで 3 回、各 3 分間洗浄する。
 - c. スライドを 100%エタノールで 2 分間洗浄する。
 - d. スライドを 100%エタノールで 1 分間洗浄する。
 - e. スライドを 95%エタノールで 1 分間洗浄する。
 - f. スライドを 70%エタノールで 1 分間洗浄する。
 - g. スライドを PBS で 3 分間洗浄する。
2. スライドを Universal HIER antigen retrieval reagent に浸し、Biocare Medical 社 Decloaker にセットし、110℃で 10 分間抗原賦活処理を行なう。
3. スライドを Ventana 社 Ultra にセットし、免疫染色を行なう。くわしい手順は下の「Ventana 社 Ultra 詳細プロトコール」を参照のこと。
 - a. 一次抗体として抗 PD-L1 ウサギ・モノクローナル抗体 RabMAb® [28-8]を Antibody Diluent で 7.5µg/ml に希釈して、スライドに滴下し、37℃で 1 時間反応させる。
 - b. 二次抗体として Anti-Rabbit HQ (Linking antibody) をスライドに滴下し、37℃で 16 分間反応後、Anti-HQ-HRP antibody (Enzyme conjugate) をスライドに滴下し、37℃で 16 分間反応させる。
 - c. スライドに ChromoMap DAB kit を使用して呈色する。
 - d. スライドに reaction buffer で調製した Hematoxylin II を滴下し対比染色を行い、その後 Bluing reagent を滴下する。

Ventana 社 Ultra 詳細プロトコール

1. Antibody [セット]
2. 1st Antibody Manual Application [セット]
3. スライドを 37℃まで温める (一次抗体)
4. スライドに一次抗体を滴下し、60 分間反応させる
5. Linking Antibody [セット]
6. 2nd Antibody [セット]

7. スライドを 37℃まで温める（二次抗体）
8. スライドに Anti-Rabbit HQ（Detection #1）を 1 滴滴下し、16 分間反応させる
9. Enzyme conjugate [セット]
10. スライドに Anti-HQ HRP（Conjugate #1）を 1 滴滴下し、16 分間反応させる
11. DAB [セット]
12. Counterstain [セット]
13. Use RB for Counterstain [セット]
14. スライドに HEMATOXYLIN II を 1 滴滴下し、8 分間反応させる（対比染色）
15. Post Counterstain [セット]
16. Use RB for Post Counterstain [セット]
17. スライドに BLUING REAGENT を 1 滴滴下し、4 分間反応させる（対比染色後反応）

脱水と封入

1. Ventana 社 Ultra からスライドを取り出す。
2. スライドを Dawn soap で洗う。
3. スライドを純水でリンスする。
4. スライドを Leica 社 ST5020 Multistainer にセットする。
5. 脱水 - スライドを以下の順番で処理する；70%エタノール（1 回、2 分間）、95%エタノール（1 回、2 分間）、100%エタノール（3 回、各 2 分間）
6. スライドをキシレンで 3 回、各 2 分間洗浄する。
7. スライドを Cytoseal Mounting Medium を用いて封入する。

Dako 社 Omnis プロトコール

試薬

- ・ 抗 PD-L1 ウサギ・モノクローナル抗体 RabMAb® [28-8] (アブカム カタログ
番号 ab205921、400 倍希釈)

フェーズ	ステップ	試薬	カタログ番号	時間	温度	サイクル
脱パラフィン	Two-Phase-Deparaffinization-IHC	[solvent]Clearify Clearing Agent [Transport]純水	[solvent] GC810	[top] 10 秒 [bottom] 1 分		1
	Two-Phase-Deparaffinization-Wash-IHC	純水		5 秒		1
抗原賦活	Demasking-IHC	EnVision FLEX TRS, Low pH	K8005	30 分	97°C	
	冷却	純水				
染色	洗浄	Wash Buffer (Dako Omnis)	GC807	2 分 40 秒		2
	一次抗体	アブカム 抗 PD-L1 ウサギ・モノクローナル抗体 RabMAb® [28-8] (400 倍希釈)	(アブカム) ab205921	1 時間		
	洗浄	Wash Buffer (Dako Omnis)	GC807	2 分		10
	内在性酵素のブロッキング	EnVision™ FLEX ブロッキング試薬	K8010 / K8024	3 分		
	洗浄	Wash Buffer (Dako Omnis)	GC807	2 分		10
	二次抗体	Envision FLEX+ ラビットリンカー	K8019	10 分		
	洗浄	Wash Buffer (Dako Omnis)	GC807	2 分		10
	標識ポリマー	ポリマー試薬	K8010 / K8024	20 分		
	洗浄	Wash Buffer (Dako Omnis)	GC807	2 分		10
	洗浄	Wash Buffer (Dako Omnis)	GC807	2 分		10
	洗浄	純水		31 秒		1
	洗浄	Wash Buffer (Dako Omnis)	GC807	2 分		10
	発色基質	発色基質	K8010 / K8024	5 分		
	洗浄	Wash Buffer (Dako Omnis)	GC807	2 分		10
	洗浄	純水		31 秒		1
	洗浄	Wash Buffer (Dako Omnis)	GC807	2 分		10
	対比染色	ヘマトキシリン	K8018	3 分		
	洗浄	Wash Buffer (Dako Omnis)	GC807	2 分		10
	洗浄	Wash Buffer (Dako Omnis)	GC807	2 分		10