



研究用試薬

貯法：2-8℃保存  
 包装：50テスト(6mL×各1本) Code: 414011  
 500テスト(17mL×各3本) Code: 414012  
 有効期間：製造後1年6ヶ月

## ヒストファイン SAB-PO(Goat)キット

### 【全般的な注意】

1. 研究用としてのみ使用すること。
2. 検体は感染の危険があるものとして取り扱いに注意すること。

### 【内容】

構成試薬 成分	製品区分	
	ユニバーサルキット	
	500テスト	50テスト
<b>ブロッキング試薬II</b> 10%ウサギ正常血清	17mL×3本	6mL×1本
<b>第二抗体</b> ビオチン標識抗ヤギ IgG 抗体 (動物種：ウサギ)	17mL×3本	6mL×1本
<b>酵素試薬</b> ペルオキシダーゼ標識ストレプト アビジン	17mL×3本	6mL×1本

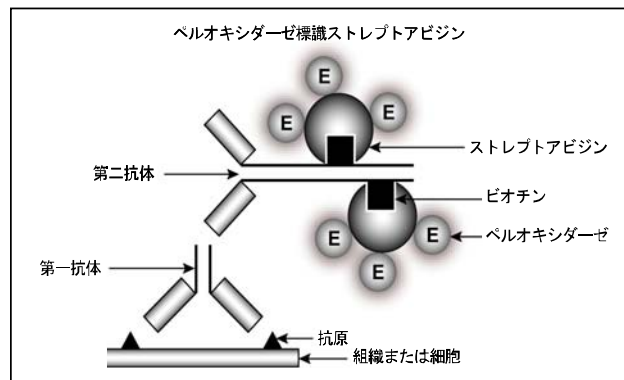
### 【用途及び原理】

組織や細胞塗抹標本、サイトスピン標本中の抗原同定は、免疫組織学および免疫細胞学的技術によって可能になる。本キットはこの技術を用い、第二抗体にはビオチンを結合、また、ビオチンと高い親和性を示すストレプトアビジンには酵素を標識して、効率的にかつ鋭敏に免疫組織化学染色を行う試薬システムである。特にストレプトアビジンに酵素を直接結合させているのが、本キットのユニークな特長である。

ストレプトアビジンは微生物(*streptomyces avidinii*)から分離された分子量6万のアビジン類似物(analog)で、卵白から分離されたアビジン(分子量6万8千)と同様に、4つの同一サブユニットで構成されている。この各サブユニットは、小さな水溶性ビタミンであるビオチン(分子量244)を非常に高い親和性( $Kd=10^{-19}$ )で結合することができる。この結合は共有結合ではないが、抗原抗体結合に比べ100万倍以上も強く、実質的には不可逆結合であると考えられている。卵白アビジンやその修飾物質のかわりにストレプトアビジンおよびその誘導体を使用することの利点は、アビジンでみられる非特異的な結合を除去できることである。非特異的結合の有無は、これら2つの蛋白質の等電点および糖含有量の違いに起因する。アビジンの等電点はpH10であるため、生理的な状態では陽性に荷電して非特異的結合を示す。これに対し、ストレプトアビジンの等電点は中性付近にある。また、非特異的結合は、組織上のレクチン様蛋白と糖鎖の相互作用によっておこるが、ストレプトアビジンは糖を含まないため、糖を7%含むアビジンと比べてバックグラウンドが低く、高いS/N(signal/noise)比が得られる。すなわち、ストレプトアビジン-ビオチン(SAB)法により、従来から行われているアビジンビオチン複合体(ABC)を用いるよりも、すぐれた感度を得られる。さらに、ストレプトアビジン-ビオチン法は、1種類の標識試薬があらゆる場合に使用できるという点で、第一抗体の動物種に応じて何種類ものPAP複合体が必要なペルオキシダーゼ抗ペルオキシダーゼ(PAP)法と比べて、たいへん有利である。

このシステムで用いる酵素は、EIAグレードの西洋わさびペルオキシダーゼである。また、第二抗体は、アフィニティ精製されアミノヘキサノイルビオチンと結合しており、ヒト血清タンパクで吸収済である。

酵素抗体法により、組織中の抗原を検出する。組織、または細胞に、まず第一抗体を反応させ、次に第二抗体(ビオチン標識抗ヤギ IgG 抗体)を反応させる。続いてペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを反応させると、ビオチンとストレプトアビジンの特異的な結合を介した、抗原-第一抗体-第二抗体-酵素標識物が形成される。この酵素活性を利用して発色基質を発色させ、抗原部位を染色する。こうして視覚化し、光学顕微鏡観察によって抗原の有無を判定する。



### 【用法・用量(操作方法)】

#### ○検体の準備

##### 【パラフィン包埋切片】

組織形態や抗原活性を維持した最適固定を得るため、できるだけ新鮮で小さな組織切片(約1cm×1cm×0.5cm)の使用と、下表の固定液の使用を勧める。

固定液	固定時間
10%(緩衝)ホルマリン	24-48時間
20%ホルマリン	12-24時間

#### 【凍結切片およびその他の標本】

不安定な抗原の場合は、凍結切片標本を用いる。組織は液体窒素あるいはドライアイス-アセトンで冷やしたn-ヘキサン中で急速凍結し、包埋にはO.C.Tコンパウンドあるいは類似の包埋剤を使用する。新しく切り出した切片は、あらかじめ0.02% poly-L-lysine水溶液などの組織切片用接着剤で被膜し空気乾燥したスライドに付着させ、十分に乾燥させた後、常温(15-25℃)10分間、100%アセトンあるいは、4℃10分間、4%パラホルムアルデヒド-PBS溶液で固定する。

もし、内因性ペルオキシダーゼあるいは赤血球や顆粒球の含量が多くない場合は内因性ペルオキシダーゼの不活性化の処理ステップを省略できる。凍結切片は、固定後、直ちに染色する。もし直ちに使用しない場合は、-80℃で保存することができるが、切片を冷凍庫で長く保存しすぎると、染色強度が落ちることがある。

#### ○切片および標本の準備

##### 【パラフィン包埋切片】

切片を4-6μmに薄切し、スライドに付着させる。もし、穏和なトリプシン処理が必要な場合は、0.02% poly-L-lysine、0.1%ネオブレンあるいはシランなどの組織切片用接着剤を使用する。

#### 【塗抹標本およびその他の標本】

塗抹標本、サイトスピン標本は染色の直前に常温(15-25℃)にもどす。塗抹標本およびサイトスピン標本は、常温(15-25℃)のアセトンで3分間あるいは冷緩衝ホルマリン・アセトンで30秒間固定する。

## 【検体標本スライドの準備】

検体標本スライドとして1検体あたり、2枚準備する。  
1枚は、試薬対照スライドとして、第一抗体のかわりにネガティブコントロール（ヤギ正常血清）を使用して染色操作を行う。

## 【検体対照スライドの準備】

### ・陽性コントロールスライド

検体標本スライドと同様の方法で作製され、あらかじめ目的抗原が存在することを確認している組織切片スライドを準備する。

### ・陰性コントロールスライド

検体標本スライドと同様の方法で作製され、あらかじめ目的抗原が存在しないことを確認している組織切片スライドを準備する。

以上の検体対照スライドを用意し、検体標本スライド及び試薬対照スライドと並行して、検体の準備から染色処理、検鏡までの全工程を行う。

## ○操作方法

### 【必要な試薬、器具】

- ・キシレン
- ・100%エタノール
- ・95%エタノール
- ・3%過酸化水素加メタノール  
(30%過酸化水素水をメタノールで10倍希釈)
- ・リン酸緩衝生理食塩水(PBS)(pH7.6±0.2)  
NaCl 7.75g  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.50g  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.20g / 精製水 1L
- ・ティッシュペーパーあるいはキムワイブ
- ・組織切片用接着剤(0.02%poly-L-lysine、0.1%ネオプレン、シランなど)
- ・ヤギ第一抗体
- ・ネガティブコントロール(ヤギ正常血清)
- ・基質溶液  
(ヒストファイン DAB 基質キット、シンプルステイン DAB 溶液あるいはシンプルステイン AEC 溶液を使用することを推奨する。)
- ・抗原賦活化液(必要な場合)
- ・対比染色試薬
- ・光学顕微鏡
- ・精製水
- ・湿潤箱
- ・非水溶性封入剤
- ・タイマー
- ・洗浄用容器
- ・カバーガラス

## 【脱パラフィン】

### 1. キシレン処理

- (1) スライドをキシレンに3分間浸す。
- (2) 余分な液を振り払い、別のキシレンに3分間浸す。
- (3) さらに、もう1つ別のキシレンで、上記ステップ1.(1)の操作をする。

### 2. エタノール処理

- (1) 100%エタノールに3分間浸す。
- (2) 余分な液を振り払い、別の100%エタノールに3分間浸す。
- (3) 余分な液を振り払い、95%エタノールに3分間浸す。
- (4) 余分な液を振り払い、別の95%エタノールに3分間浸す。

### 3. 洗浄

- (1) 余分な液を振り払い、PBSに5分間浸す。
- (2) もし、固定液として、B5やZenker's液を使用した場合は、水銀の除去処理をする。

## 【操作方法（染色手順）】

### 1. ブロッキング試薬による処理(内因性ペルオキシダーゼの除去)

- (1) 余分な水分を取り除くためスライド上の切片周辺を注意深く拭く。
- (2) 切片が完全に覆われるように、すべてのスライドをブロッキング試薬(3%過酸化水素加メタノール)に浸し、常温(15-25℃)で10-15分間反応させる。
- (3) PBSでよくすすぐ(5分間ずつ容器を2度かえるか、洗浄びんを使用する。)

### 2. ブロッキング試薬IIによる処理

- (1) スライド上の切片周辺を注意深く拭く。
- (2) 切片が完全に覆われるように、すべてのスライドにブロッキング試薬IIを1-2滴(50-100μL)滴下し、常温(15-25℃)で10分間反応させる。
- (3) 余分なブロッキング試薬IIを振り払う。

### 3. 第一抗体の添加・反応

- (1) スライド上の切片周辺を注意深く拭く。
- (2) 切片が完全に覆われるようにヤギ第一抗体を2滴(100μL)検体標本スライド、陽性コントロールスライドおよび陰性コントロールスライドに滴下する。
- (3) 試薬対照スライドにはヤギ第一抗体の代わりにネガティブコントロール(ヤギ正常血清)を2滴(100μL)滴下する。
- (4) 常温(15-25℃)あるいは4℃で反応させる(第一抗体についての添付書のインキュベーション時間を守る)。
- (5) PBSでよくすすぐ。

### 4. 第二抗体の添加・反応

- (1) スライド上の切片周辺を注意深く拭く。
- (2) 切片が完全に覆われるように第二抗体を2滴(100μL)すべてのスライドに滴下する。常温(15-25℃)で10分間反応させる。
- (3) PBSでよくすすぐ。

### 5. 酵素試薬の添加・反応

- (1) スライド上の切片周辺を注意深く拭く。
- (2) 切片が完全に覆われるように酵素試薬を2滴(100μL)すべてのスライドに滴下する。常温(15-25℃)で5分間反応させる。
- (3) PBSでよくすすぐ。

### 6. 基質溶液の添加・反応

- (1) スライド上の切片周辺を注意深く拭く。
- (2) 切片が完全に覆われるように基質溶液を2滴(100μL)すべてのスライドに滴下する。常温(15-25℃)で5-20分間インキュベートする。
- (3) 精製水でよくすすぐ。

## 【対比染色】

- (1) 対比染色試薬にスライドを浸す。
- (2) 流水洗する。

## 【封入】

基質溶液がAEC発色の場合はそのまま水溶性封入剤で、DAB発色の場合は、水洗、脱水、キシレンによる透徹後、非水溶性封入剤で封入する。

## 【測定結果の判定法】

### ○判定方法

光学顕微鏡によって陽性反応を観察する。  
染色結果の判定は、3種類の対照スライドとの比較により行う。

#### ・陽性コントロールスライド

陽性所見が得られる。

#### ・陰性コントロールスライド

陽性を呈する細胞が認められない。

#### ・試薬対照スライド

陽性を呈する細胞が認められない。このスライドが染色されれば、非特異的なタンパク結合などによる非特異的反応が考えられる。

### ○判定上の留意事項

- (1) 必ず各検体対照スライドの染色結果と比較して、染色結果を判定すること。
- (2) 明瞭な染色を得るには、包埋剤を完全に除去することが大切である。パラフィンの残存物は、バックグラウンド染色を強める原因となる。
- (3) 一般的にタンパク質や基質反応生成物の非免疫的結合により、偽陽性結果が観察される場合がある。偽陽性結果は赤血球による偽ペルオキシダーゼ反応やサイトクロームCによる内因性ペルオキシダーゼ反応によっても起きることがある。
- (4) 検体組織の壊死部分は、抗体が非特異的に結合しやすく、非特異染色の原因となりやすいため、陰性コントロールスライドと比較し、十分注意して判定すること。
- (5) 間質系のコラーゲンは固定後疎水性となって抗体と結合しやすくなり、また、陰性に帯電しているため陽性に帯電している抗体と結合しやすく、非特異染色の原因となりやすいため、陰性コントロールスライドと比較し、十分注意して判定すること。
- (6) 顆粒球の一部およびマクロファージなどは細胞膜表面にFcレセプターを有するため、抗体のFc部分と結合する可能性がある。抗体本来の特異的反応部位以外に染色が現れることがあるため、必ず陰性コントロールスライドと比較し、十分注意して判定すること。

## 【使用上又は取り扱い上の注意】

### 1. 取り扱い上（危険防止）の注意

- (1) ヒト由来の検体は、取り扱い者に感染を引き起こす危険性がある。従って、適切な取り扱いを必要とする。
- (2) 検体組織にはHIV、HBVなど、感染のおそれがあるので、取り扱いには十分注意すること。
- (3) 皮膚などへの接触はさけること。

### 2. 使用上の注意

- (1) 試薬は2-8℃にて保存する。
- (2) すべての試薬は使用前に常温(15-25℃)に戻して使用すること。
- (3) 使用期限の過ぎた試薬は使用しないこと。
- (4) 染色過程のいかなる時点においても切片を乾燥させてはならない。試薬と反応させている間、切片を湿潤箱に入れておくと乾燥を防ぐことができる。
- (5) 抗原は熱に弱いので、組織を包埋する際に、パラフィンの温度を58℃以上に上げてはならない。

- (6) 脱パラフィンに用いるキシレンおよびエタノールは、スライドを40枚処理するごとに取り替える。
- (7) ステロイドやその他小さな分子は、有機溶媒に極めて溶けやすく、抗原の損失を防ぐには、固定剤の選択に注意する必要がある。
- (8) 各構成試薬は、個別に補充できる。

### 3. 廃棄上の注意

- (1) 検体組織に接触した器具・試薬および試薬容器等は感染の危険性があるので、オートクレーブで120℃、20分間滅菌処理するか、または1.0V/V%次亜塩素酸などの消毒液に浸して一晩処理すること。

### 妨害物質と問題対策\*

問題点	考えられる原因	その対策
○陽性コントロールスライドおよび標本スライドの染色が認められない、あるいは弱い。*	① 切片が乾燥している。	・切片を湿潤させた後は、湿潤箱などを用いて乾燥させない。
	② 包埋剤が不適當あるいはパラフィン包埋組織からのパラフィン除去が不完全である。	・適當な包埋剤を選択する。また、包埋組織から、パラフィンを完全に除去する。 ・キシレン、エタノール溶液を取り替える。
	③ 緩衝液中の微量のアジ化ナトリウムがペロオキシダーゼを不活性化し、染色を不可能にする。	・アジ化ナトリウムを含有しない緩衝液を使用する。 ・緩衝液を取り替える。
	④ 酵素や抗体反応が不十分。	・古い基質溶液を取り替える。* ・各ステップでの、水分の拭き取りを完全ににする。 ・抗体との反応時間を十分ににする。特に、第一抗体では添付書のインキュベーション時間を守る。
○陽性コントロールスライドは染色されるが、標本スライドは染色されない。*	① 抗原が固定あるいは包埋過程で変性したり、マスクされている。	・抗原の中には、固定や包埋に敏感なものがあるので、穏やかな固定剤を使用し固定時間を短縮する。 ・場合によっては、染色前に抗原を露出させるため、熱による抗原賦活化処理あるいはトリプシンなどのタンパク分解酵素処理を行う。
	② 自己消化により抗原が破壊されている。	・可能な限り、生検あるいは外科組織を使用する。
	③ 組織に存在する抗原が少ない。	・インキュベーション時間を長くする。
○全ての染色スライドにバックグラウンドが見られる。*	① 内因性ペロオキシダーゼを不活性化するための処理が不十分。*	・ブロッキング試薬(3%過酸化水素加メタノール)による処理を確実にを行う。*
	② 内因性ビオチン(ビタミンB <sub>7</sub> )が多量に存在する。*	・内因性アビジン・ビオチンブロッキングキット(コード:415041)などによる処理を行う。*
	③ 非特異結合成分がブロックされていない。	・ブロッキング試薬II(10%ウサギ正常血清)の操作を確実にを行う。
	④ 自己消化の結果、組織液に遊離した抗原が過剰に存在する。	・可能な限り、新鮮な組織を包埋する。
	⑤ 不完全なパラフィン除去。	・キシレン、エタノール溶液を取り替える。
	⑥ 不十分な抗体の洗浄。	・抗体の洗浄を十分にを行う。
	⑦ 室内温度が高すぎて、酵素反応が早すぎる。	・常温(15-25℃)にコントロールする。 ・反応時間を短縮する。
○反応中に組織切片がスライドからはがれてしまう。	① 抗原によってはその同定のために、熱による抗原賦活化処理あるいは第一抗体との長時間の反応を必要とする。このような場合には、はがれ易くなる。	・0.02%poly-L-lysine、0.1%ネオブレン、シランなどの組織切片用接着剤を使用する。

### 【貯蔵方法・有効期間】

貯蔵方法：2-8℃で保存

有効期間：製造後1年6ヶ月（使用期限は外箱に表示）

### 【包装単位】

構成試薬	製品名	コード	包装単位
ブロッキング試薬II 第二抗体 酵素試薬	ヒストファイ SAB-PO(Goat)キット	414011	50テスト
		414012	500テスト
ブロッキング試薬II	10%ウサギ正常血清	下記参照	
第二抗体	ビオチン標識抗ヤギIgG抗体 (動物種：ウサギ)	416021	6mL
		416022	17mL
酵素試薬	ペロオキシダーゼ標識ストレプトアビジン	下記参照	

以下の製品はSAB-PO(Goat)キットの構成試薬として単独では販売していないがSAB-PO(M)キットの構成試薬が使用できる。

構成試薬	製品名	コード	包装単位
ブロッキング試薬II	10%ウサギ正常血清	426051	6mL
		426052	17mL
酵素試薬	ペロオキシダーゼ標識ストレプトアビジン	426061	6mL
		426062	17mL

製品名	コード	包装単位
ヒストファイ DAB 基質キット	425011	500テスト
発色基質 (試薬A)		3mL×1本
基質緩衝液 (試薬B)		3mL×1本
発色試薬 (試薬C)		3mL×1本

### 【主要文献】

- Guesdon, J.L, Ternynck, T, Avrameas, S. : The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. J. Histochem. Cytochem. 27: 1131-1139, 1979
- Warnke, R, Levy, R. : Detection of T and B cell antigens with hybridoma monoclonal antibodies: A biotin-avidin-horseradish peroxidase method. J. Histochem. Cytochem. 28: 771-776, 1980
- Kitamoto, T, Ogomori, K, Tateishi, J, Prusiner, S.B. : Methods in laboratory investigation. Formic acid pretreatment enhances immunostaining of cerebral and systemic amyloids. Laboratory investigation. 57: 230-236, 1987.
- 大谷明夫, 名倉 宏 : 血管内皮細胞の免疫機能. 炎症性腸疾患を場として. 日本網内系学会誌 31: 303-311, 1991.
- Suzuki, K, Katoh, R, Kawaoi, A. : Immunohistochemical demonstration of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in formalin-fixed, paraffin-embedded sections from rat and human tissues. Acta Histochem. Cytochem. 25: 13-21, 1992.
- Gomi, T, Kikuchi, Y, Adriaensen, D, Timmermans, J.-P, De Groodt-Lasseel, M.H. A., Kimura, A., Naruse, H, Isikawa, Y, Kishi, K, Scheuermann, D.W. : Immunocytochemical survey of the neuroepithelial endocrine system in the respiratory tract of the Tokyo salamander, *Hynobius nebulosus tokyoensis* TAGO. Histochem. 102: 425-431, 1994.
- Kogawa, K, Hisai, H, Morii, K, Horimoto, M, Kuya, T, Sakamaki, S, Watanabe, N., Niitsu, Y. : T-cell mediated polyclonal B-cell activation in a case of B-cell lymphoma associated with polyclonal hypergamma-globulinemia. Int. J. Hematol. 62: 253-257, 1995
- Satoh, F, Murakami, O, Takahashi, K, Ueno, J, Nishikawa, T, Abe, K, Mouri, T, Sasano, H. : Double adenomas with different pathological and hormonal features in the left adrenal gland of a patient with Cushing's syndrome. Clinical Endocrinology. 46: 227-234, 1997.

問合せ先、製造販売元、販売元は裏面に記載。

【問合せ先、製造販売元、販売元】

**株式会社ニチレイバイオサイエンス** 

〒104-8402 東京都中央区築地 6-19-20

TEL : 03-3248-2208 FAX : 03-3248-2243