



研究用試薬

ヒストファイン

ペルオキシダーゼ標識ポリマー試薬
ヒストファイン シンプルステインヒトMAX-PO(R)

包装： 170テスト コード： 414141
包装： 500テスト コード： 414142
包装： 1500テスト コード： 414144

製造販売元
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

【測定原理】

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。本品は、多数の酵素(ペルオキシダーゼ)と第二抗体をアミノ酸ポリマーに結合させた試薬であるペルオキシダーゼ標識ポリマー試薬を用いることによって、効率的にかつ鋭敏に免疫組織染色を行うことができる。

ストレプトアビジン-ビオチン(SAB)法では第一抗体と反応後、ビオチン化第二抗体および酵素標識ストレプトアビジンとの2段階の反応が必要であるが、本品のペルオキシダーゼ標識ポリマー試薬はアミノ酸ポリマーに酵素と第二抗体が結合しているため、これらの操作を1段階に省略できる点がユニークな特徴である。また、アビジン-ビオチン系を使用しないため内因性ビオチンの影響を受けない。

第二抗体には免疫した動物血清より精製したIgGフラクションを消化したFab'を使用している。抗原を用いたアフィニティークロマトグラフィーで精製、更にこれをヒト血清タンパク質で吸収している。また、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。

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、まず検出の対象となる抗原に対するウサギ由来の第一抗体を反応させ、次に酵素と第二抗体を結合させたペルオキシダーゼ標識ポリマー試薬(ペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgGポリクローナル抗体(Fab'))を反応させる。その結果、抗原・抗体・ポリマー・酵素の複合体を形成することができる。この複合体の酵素活性を利用して基質を発色させ、抗原部位を染色する。このようにして視覚化し、光学顕微鏡観察によって抗原の有無を判定する。

1. 内容

試薬	包装		
	170 テスト	500 テスト	1500 テスト
ヒストファイン シンプルステインヒトMAX-PO(R) ペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgGポリクローナル抗体(Fab') (動物種：ヤギ)	17mL ×1本	17mL ×3本	17mL ×9本

2. 使用目的

本品は、免疫組織化学および免疫細胞化学染色において、酵素標識ポリマー法を用い、組織切片、細胞塗抹標本またはサイトスピン標本中の抗原をペルオキシダーゼ反応により可視化することを目的とする。

ウサギ第一抗体用である。

研究用としてのみ使用すること。

3. 使用方法

○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

○切片および標本の準備

【パラフィン包埋切片】

切片を3～6μmに薄切し、poly-L-lysineまたはシラン等の切片用接着剤をコーティングしたスライドに貼り付ける。37℃の恒温器で十分に乾燥させる。

【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】

・陽性対照スライド

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。

・陰性対照スライド

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、検体標本スライドおよ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
 - K₂HPO₄ 1.50g
 - KH₂PO₄ 0.20g
 - 精製水1L
- ・実験用ワイブ
- ・スライドガラス(poly-L-lysineまたはシラン等をコーティングしたスライド)
- ・第一抗体
- ・発色用試薬(基質溶液)
- ・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
- ・封入剤
- ・タイマー
- ・洗浄用容器
- ・カバーガラス
- ・ネガティブコントロール
- ・対比染色試薬

【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)さらに95%エタノールで、上記のように2回処理する。

3.洗浄

余分な液を振り払い、PBSに5分間浸す。

【操作方法 (染色手順)】

※使用する第一抗体によっては抗原賦活化処理が必要な場合がある(抗原賦活化処理条件は各第一抗体の使用説明書に従う)。

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、または洗浄びんを使用する)。

2.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第一抗体を2滴(約100μL)検体標本スライド、陽性対照スライドおよび陰性対照スライドに滴下する。
- (3)試薬対照スライドには、第一抗体のかわりにネガティブコントロールを2滴(約100μL)滴下する。
- (4)反応させる(反応温度、反応時間は、各第一抗体の使用説明書に従う)。
- (5)PBSでよくすすぐ。

3. ヒストファイン シンプルステインヒト MAX-PO(R)(ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG ポリクローナル抗体(Fab) (動物種: ヤギ))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ヒストファイン シンプルステインヒト MAX-PO(R)を2滴(約100μL)すべてのスライドに滴下する。常温で30分間反応させる。
- (3) PBSでよくすすぐ。

4. 発色用試薬(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発色用試薬を2滴(約100μL)すべてのスライドに滴下し、反応させる(反応温度、反応時間は各発色用試薬の使用説明書に従う)。
- (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]

水洗、脱水、キシレンによる透徹後、封入剤で封入する。

○ 操作上の注意

- (1) 組織の固定状況などが染色結果に影響を及ぼすため学会などが推奨する固定液や固定時間を遵守し、検体の取扱いには十分注意すること。
- (2) ステロイドなどの低分子は、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。
- (3) 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。
- (4) 組織の固定条件などにより、抗原賦活化処理を行うことで良好な染色結果が得られる場合がある。
- (5) 染色条件を変更することで良好な染色結果が得られる場合があるが、組織へのダメージや偽陽性化、偽陰性化が起こるおそれがあるため、研究者自身の責任において至適条件をよく検討すること。
- (6) 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こと乾燥を防ぐことができる。
- (7) 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。
- (8) 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ので、陰性対照スライドと比較し、十分注意して判定すること。
- (9) 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ので、陰性対照スライドと比較し、十分注意して判定すること。
- (10) 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、第一抗体の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、必ず陰性対照スライドと比較し、十分注意して判定すること。

4. 貯法及び使用上の注意

1. 2～8℃で保存すること。
2. 使用期限はラベルに記載されているので使用前に確認すること。
3. 使用前に常温に戻すこと。
4. 使用後は速やかに冷蔵保存すること。
5. 異なるロットの試薬や他製品の試薬を混ぜたりしないこと。

5. 取扱い上(危険防止)の注意

1. 使用期限の過ぎた試薬は使用しないこと。
2. 本品に関する化学物質の安全情報は安全データシート(SDS)を参照すること。
3. 本品を吸い込んだり、眼、口、皮膚、衣類などへの接触を避けること。
4. 本品の廃棄の際には、各施設や地域および国のルールに従い、適切に廃棄すること。
5. 本品は、動物由来成分を含むので、取扱いに注意すること。
6. ヒト由来の検体は、感染のおそれがあるので取扱いには十分注意し、医療廃棄物などに関する規定および水質汚濁防止法などの規制に従って処理するとともに、免疫染色を実施するにあたって関連技術および操作方法を十分習熟しておくこと。

6. 参考文献

- (1) 川井健司 他. 3)増感法. 病理と臨床. 2000;18(臨時増刊):38-43.