

## 研究用試薬

## ヒストファイン シンプルステイン AP(M)

## HISTOFINE 免疫組織化学染色試薬 貯法 2 - 8 保存

包装 : 170テスト(17mL×1本) Code : 414241

有効期間 : 製造後1年6ヶ月

## 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

## 1. 内 容

アミノ酸ポリマーに、アルカリフォスファターゼとFab'にした抗マウスIg(動物種:ヤギ)を結合させた標識ポリマー。

液状。安定化タンパク質と抗菌剤を含むMOPS(3-Morpholinopropanesulfonic acid)緩衝液(pH 6.5)にて即時使用可能な濃度に調製済み。

## 2. 用途及び原理

マウス第一抗体に用いる免疫組織化学染色用試薬。組織切片上の抗原に結合したマウス第一抗体に反応させることで、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、基質を発色させることで、抗原部位を染色することが可能である。

## 3. 製 法

1. 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、F(ab')<sub>2</sub>を作製する。
2. 抗原を用いたアフィニティークロマトグラフィーで抗原特異的なF(ab')<sub>2</sub>を精製する。
3. 固相化したヒト血清タンパク質による吸収操作を行う。
4. アルカリフォスファターゼとアミノ酸ポリマーを結合させ、それにF(ab')<sub>2</sub>を還元して得たFab'を結合させる。

## 4. 操作方法

## 必要な試薬、器具

キシレン	EDTA入り採血管
100%エタノール	カバーガラス
95%エタノール	光学顕微鏡
対比染色試薬	精製水
リン酸緩衝生理食塩水(PBS)(pH7.6±0.2)	湿潤箱
NaCl 7.75g	封入剤
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1.50g	タイマー
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.20g	洗浄用容器
組織切片用接着剤(0.02%poly-L-lysine、シランなど)	ティッシュペーパー
	ドライヤー(冷風用)

0.01M トリス塩酸緩衝液生理食塩水(TBS)(pH7.5)

(1) トリス 12.11 gを精製水に溶かし塩酸でpH 7.5に調整後、精製水で全量を1 Lとする(A液)。

(2) NaCl 87.66 gを精製水に溶かし、精製水で全量を1 Lとする(B液)。

(3) A液とB液をそれぞれ100mLずつとり、精製水で全量を1 Lとする。

基質溶液(ヒストファイン ニューフクシン基質キット、ファーストブルー基質キットあるいはファーストレッド基質キット)

Buffered Formalin Acetone(BFA)

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	15mg	左記容量の試薬を精製水に溶解し、調整する。
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	120mg	注)第一抗体としてCD20を使用する場合は、最終アセトン濃度が40%になるように調整する。
精製水	30mL	
アセトン	45mL	
ホルマリン	25mL	

## 検体の準備

[血液塗抹標本]

- (1) 採血後、ただちにEDTAを加え、抗凝固処理を行い、スライドに塗抹する。
- (2) ドライヤー(冷風)等で十分に乾燥する(20 - 30分)。この乾燥が十分に行われないと標本の薄利などの原因となる。
- (3) BFAで固定する(4、30秒間)。
- (4) 流水洗す(30 - 60秒間)。
- (5) 余分な液を振り払い、PBSに5分間浸す。

[パラフィン包埋切片]

- (1) 高濃度の固定液にさらしたり、長時間の固定を行うと、組織崩壊や抗原変性を生じさせることがある。従って、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

- (2) 切片を3 - 6μmに薄切し、スライドに付着させる。もし、熱による抗原賦活化処理やトリプシン処理を行う場合は、0.02%poly-L-lysine あるいはシランなどの組織切片用接着剤を使用する。

## 3. 洗浄

1. キシレン処理
 

スライドをキシレンに3分間浸す。

余分な液を振り払い、別のキシレンに3分間浸す。

さらに、もう1つ別のキシレンで、上記ステップ1. の操作をする。
2. エタノール処理
 

100%エタノールに3分間浸す。

余分な液を振り払い、別の100%エタノールに3分間浸す。

さらに、95%アルコールで、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でよくすすぐ。(5分間ずつ容器をかえるか、または洗浄ピンを使用する。)

[凍結切片およびその他の標本]

不安定な抗原の場合、凍結切片標本を用いる。

- (1) 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。
- (2) 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、ドライヤー(冷風)等で十分に乾燥する(20 - 30分)。この乾燥が十分に行われないと標本の薄利などの原因となる。
- (3) 100%アセトンあるいは、4%パラホルムアルデヒド - PBSで4、10分間、固定する。
- (4) 余分な液を振り払い、PBSでよくすすぐ。(5分間ずつ容器をかえるか、または洗浄ピンを使用する。)

スライドは直ちに染色する。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。

[対照スライドの準備]

検査の行程管理として、検体標本スライドと同じ方法により、陽性対照スライド、陰性対照スライドおよび試薬対照スライドを各1つずつ用意し、検体標本スライドと平行して、検体の準備から染色処理、検鏡までの全行程を行う。

## 染色手順

## 1. 第一抗体の添加・反応

- (1) スライド上の標本周辺を注意深く拭く。
- (2) 標本が完全に被われるように第一抗体2滴を各標本スライド、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(正常血清)2滴を滴下する。
- (4) 常温あるいは4で反応させる(各第一抗体についている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。

## 2. シンプルステイン AP(M)の添加・反応

- (1) スライド上の標本周辺を注意深く拭く。
- (2) 標本が完全に被われるようにシンプルステイン AP(M) 2滴を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) TBSですすぐ。

## 3. 基質溶液の添加・反応

- (1) スライド上の標本周辺を注意深く拭く。
- (2) 標本が完全に被われるように基質溶液2滴を滴下する。常温で5 - 20分間反応させる。
- (3) 精製水でよくすすぐ。

## 4. 対比染色

- (1) 対比染色試薬にスライドを浸す。
- (2) 流水洗す。

## 5. 封入

ファーストブルー基質キット、ファーストレッド基質キットを使用する場合水溶性封入剤で封入する。ニューフクシン基質キットを使用する場合には水溶性封入剤で封入するか、乾燥による脱水の後、キシレンに数秒間浸して透徹し、非水溶性封入剤で封入して永久標本とする。

## 判定

## 1. 検鏡

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必要がある。

陽性対照スライド

検体と同じ方法で作製した、目的抗原を含む標本。

陰性対照スライド

検体と同じ方法で作製した、目的抗原を含んでいない標本。

試薬対照スライド

検体と同じスライドをもう1枚準備し、第一抗体のかわりにネガティブコントロールを使って同様の染色操作を行う。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。

## 5. 妨害物質と問題対策

問題点	考えられる原因	その対策
陽性対照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。	標本が乾燥している。  包埋剤が不適当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。  酵素や抗体反応が不十分。	標本を湿潤させた後は、湿潤箱などを用いて乾燥させない。 適当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。 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する。 抗体との反応時間を十分にする。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。 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。 可能な限り、生検あるいは外科組織を使用する。 インキュベーション時間を長くする。 基質・色素混合液の中にレバミゾールを添加する。(精製水の代わりに1mMレバミゾール溶液を使用する。)
陽性対照スライドは染色されるが、標本スライドは染色されない。	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。	ブロッキング試薬の操作を確実に行う。 可能ならば、新鮮な組織を包埋する。
全ての染色スライドのバックグラウンドが強く染色される。	自己消化により抗原が破壊されている。 組織に存在する抗原が少ない。 内因性アルカリフォスファターゼの活性を不活性化するための処理が行われていない。 非特異結合成分がブロックされていない。 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。 不完全なパラフィン除去。 不十分な抗体の洗浄。 室温が高すぎて、酵素反応が早すぎる。 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。	キシレン、エタノール溶液を取り替える。 抗体の洗浄を十分に行う。 常温(15 - 25)にコントロールする。 反応時間を短縮する。 0.02%poly-L-lysine、シランなどの組織切片用接着剤を使用する。
反応中に組織切片がスライドからはがれてしまう。		

## 6. 使用上又は取扱い上の注意

1. 試薬は冷暗所(2 - 8 )に保存する。
2. 有効期間の過ぎた試薬は使用しない。

## 7. 貯法および有効期間

冷暗所(2 - 8 )で保存。 有効期間は製造後1年6ヶ月。

文献請求先

株式会社ニチレイバイオサイエンス 営業部

TEL:03-3248-2208

ホームページお問合せ画面:<http://www.nichirei.co.jp/bio/inquire/index.html>