



研究用試薬

パラフィン包埋切片用

## ヒストファイン マウスステインキット

貯 法 : 2-8℃保存

包 装 : 50テスト(6mL × 各1本) Code : 414321

: 500テスト(17mL × 各3本) Code : 414322

有効期間 : 製造後1年6ヶ月

### 【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。

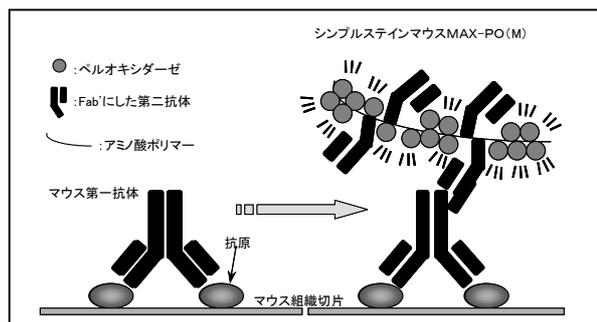
### 【内容および製法】

マウスステインキットは3種類の試薬から構成される。

構成試薬	包装単位
①ブロッキング試薬A 液状。即時使用可能な濃度に調製済み。	6mL×1本 または 17mL×3本
②ブロッキング試薬B 液状。即時使用可能な濃度に調製済み。	6mL×1本 または 17mL×3本
③シンプルステインマウスMAX-PO(M) 液状。 アミノ酸ポリマーに、ペルオキシダーゼとFab'にした抗マウスIgG(動物種: ヤギ)を結合させた標識ポリマー。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。 【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. ペルオキシダ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。	6mL×1本 または 17mL×3本

### 【用途及び原理】\*\*

マウス組織用免疫組織化学染色試薬。マウス第一抗体に用いる。酵素抗体法により、組織中の抗原を検出する。①ブロッキング試薬Aで処理したマウス組織切片上の抗原にマウス第一抗体を反応させ、次に②ブロッキング試薬Bで処理することで内因性マウス免疫グロブリンとの反応性を阻止する。マウス組織切片上の抗原に結合したマウス第一抗体に③シンプルステインマウスMAX-PO(M)を反応させることで、抗原・抗体・ポリマー・酵素の複合体が形成される。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。



### 【用法・用量(操作方法)】

#### ○検体の準備

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、スライドに付着させる。もし、熱による抗原賦活化処理やタンパク分解酵素処理を行う場合は、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。

#### 【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(マウス正常血清)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

##### ・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

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】

- ・スライドガラス
- ・乾燥器
- ・染色ドーゼ
- ・キシレン
- ・洗浄用容器
- ・PBS(「PBS Code:415223」を使用することを推奨する。または下記にて調製する。)  
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
- ・スライドスタンド
- ・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)
- ・マウス第一抗体
- ・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。)
- ・対比染色試薬
- ・カバーガラス
- ・ティッシュペーパー
- ・組織切片用接着剤(0.02%poly-L-lysine、シランなど)
- ・抗原賦活化液(必要な場合)
- ・タイマー
- ・95%エタノール
- ・100%エタノール
- ・精製水
- ・湿潤箱
- ・ネガティブコントロール(マウス正常血清)
- ・封入剤
- ・光学顕微鏡

#### 【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) 余分な液を振り払い、さらに別のキシレンに3分間浸す。

##### 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

余分な液を振り払い、PBS でよくすすぐ(PBS に5分間浸す)。

## 【染色手順】

1.3%過酸化水素加メタノールによる処理  
(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3%過酸化水素加メタノール溶液に浸し、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.ブロッッキング試薬A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①ブロッッキング試薬Aを2滴すべてのスライドに滴下する。常温で60分間反応させる。
- (3) PBSでよくすすぐ。

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マウス第一抗体2滴を各標本スライド、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、マウス第一抗体のかわりにネガティブコントロール(マウス正常血清) 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。

4.ブロッッキング試薬B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②ブロッッキング試薬Bを2滴すべてのスライドに滴下する。 常温で10分間反応させる。
- (3) PBSでよくすすぐ。

5.シンプルステインマウスMAX-PO(M)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③シンプルステインマウスMAX-PO(M)を2滴すべてのスライドに滴下し、常温で10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2滴を滴下し、常温で5-20分間反応させる。
- (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発色の場合はこ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ので、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ので、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) 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) 皮膚などへの接触は避けること。

### 2.使用上の注意

- (1) 試薬は2-8℃で保存すること。
- (2) 使用前に常温(15-25℃)に戻して使用すること。
- (3) 有効期間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こ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。

### 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/%次亜塩素酸などの消毒液に浸して一晚処理すること。

**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。	①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。	②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。 ②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ルオキシダーゼを不活性化し、染色を不可能にする。	③アジ化ナトリウムを含有しない緩衝液を使用する。 ③緩衝液を取り替える。
	④酵素や抗体反応が不十分。	④古い基質溶液を取り替える。 ④各ステップでの水分の拭き取りを完全に する。 ④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。
○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。	①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。 ①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。	②採取した組織はすみやかに適切な方法で固定を行うこと。
	③組織に存在する抗原が少ない。	③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のバックグラウンドが強く染色される。	①内因性ペルオキシダーゼを不活性化するための処理が不十分。	①3%過酸化水素加メタノールによる処理を確実に 行う。
	②内因性マウス免疫グロブリンを阻害するための処理が不十分。	②ブロッキング試薬A、ブロッキング試薬Bによる処理を確実に 行う(反応時間厳守)。 ②ブロッキング試薬A、ブロッキング試薬Bを完全に常温(15-25℃)まで戻す。
	③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。	③可能ならば新鮮な組織を包埋する。
	④不完全なパラフィン除去。	④キシレン、エタノール溶液を取り替える。
	⑤不十分な抗体の洗浄。	⑤抗体の洗浄を十分に 行う。
	⑥室内温度が高すぎて、酵素反応が早すぎる。	⑥常温(15-25℃)にコントロールする。 ⑥反応時間を短縮する。
	⑦切片が乾燥している。	⑦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。
○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。	①0.02%poly-L-lysine、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℃保存  
有効期間：製造後1年6ヶ月

**【包装単位】\*\***

製品名	コード	包装単位
ヒストファイน์ マウスステインキット	414321	50 テスト (6mL×各1本)
	414322	500 テスト (17mL×各3本)

上記キットと組み合わせて使用することを推奨する。

製品名	コード	包装単位
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

問合せ先、製造販売元、販売元は次頁に記載。

**\*\* ■ 参考(凍結切片を用いて染色を行う場合)**

本製品は、凍結切片を用いた免疫組織化学染色法に適用する場合、以下の注意事項、操作方法を参考にすること。

**【凍結切片を用いて染色を行う場合の注意】**

- 凍結切片作製方法について  
組織は、固定組織を使用すること。未固定組織を使用すると良好な結果が得られない場合がある。  
注) 固定組織：固定後、凍結・薄切された組織  
未固定組織：凍結・薄切後に組織を固定させた組織(新鮮凍結組織)
- 固定液について  
第一抗体により適する固定液は異なるので、固定液の検討は十分に行うこと。
- 本製品の反応時間について  
本製品は、パラフィン包埋切片用に各試薬の濃度、反応時間を設定している。凍結切片でも同様の濃度、反応時間で使用できるが、マウスの系統・組織により、バックグラウンド染色がみられる場合があるので、十分確認の上、使用すること。

**【用法・用量(操作方法)】**

**○検体の準備**

**【凍結切片】**

不安定な抗原の場合は、凍結切片標本を用いる。  
4%パラホルムアルデヒドなどの固定液を用いて組織を固定(4℃、一晚)後、O.C.T. コンパウンドあるいは類似の包埋剤とともに、液体窒素あるいはドライアイス-アセトン、ドライアイス-エタノールなどで急速凍結する。  
凍結した切片を4-6μmに薄切し、あらかじめ0.02%poly-L-lysine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、十分に乾燥後、水溶性の凍結用包埋剤を取り除くため、PBSでよくすすぐ。

検体標本スライドの準備、検体対照スライドの準備、必要な試薬、器具、染色手順、測定結果の判定法、使用上又は取り扱い上の注意等は、P1、P2記載内容を参照のこと。

<p>●脱パラフィン（パラフィン包埋切片）*脱パラフィンを完全にするために、各溶液はスライド20枚ごとに取り換えることが好ましい。</p>		
<p>キシレン 3分間    キシレン 3分間    キシレン 3分間    100%エタノール 3分間    100%エタノール 3分間    95%エタノール 3分間    95%エタノール 3分間    PBS 5分間</p> <p>*各ステップごとによく液を切る。</p>		
<p>●3%過酸化水素加メタノールによる内因性ペルオキシダーゼ処理</p>		
<p>ティッシュ</p> <p>切片の周囲の余分な水分を拭き取る。</p> <p>3%<math>H_2O_2</math>加メタノールに浸す。 (常温、10-15分間)</p>	<p>PBSで洗浄する。 (常温、5分間、2回)</p>	
<p>●ブロッキング試薬 A の添加・反応</p>		
<p>ティッシュ</p> <p>切片の周囲の余分な水分を拭き取る。</p>	<p>①ブロッキング試薬A</p> <p>切片が完全に覆われるように、①ブロッキング試薬Aを滴下する。(常温、60分)</p>	<p>PBSで洗浄する。 (常温、5分間、2回)</p>
<p>●第一抗体の添加・反応</p>		
<p>ティッシュ</p> <p>切片の周囲の余分な水分を拭き取る。</p>	<p>第一抗体</p> <p>切片が完全に覆われるように、第一抗体を滴下する。(常温または4℃)</p>	<p>PBSで洗浄する。 (常温、5分間、2回)</p>
<p>●ブロッキング試薬 B の添加・反応</p>		
<p>ティッシュ</p> <p>切片の周囲の余分な水分を拭き取る。</p>	<p>②ブロッキング試薬B</p> <p>切片が完全に覆われるように、②ブロッキング試薬Bを滴下する。(常温、10分)</p>	<p>PBSで洗浄する。 (常温、5分間、2回)</p>
<p>●シンプルステインマウスMAX-PO (M) の添加・反応</p>		
<p>ティッシュ</p> <p>切片の周囲の余分な水分を拭き取る。</p>	<p>③シンプルステインマウスMAX-PO (M)</p> <p>切片が完全に覆われるように、③シンプルステインマウスMAX-PO (M)を滴下する。(常温、10分間)</p>	<p>PBSで洗浄する。 (常温、5分間、2回)</p>
<p>●シンプルステイン基質溶液の添加・反応 *シンプルステイン基質溶液の他、ペルオキシダーゼ用の各種基質溶液も使用できます。</p>		
<p>ティッシュ</p> <p>切片の周囲の余分な水分を拭き取る。</p>	<p>シンプルステイン基質</p> <p>切片が完全に覆われるように、シンプルステイン基質溶液を滴下する。(常温、5-20分間)</p>	<p>精製水でよくすすぐ。</p>
<p>●対比染色 対比染色試薬にスライドを浸した後、流水でよくすすぐ。</p>		
<p>●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。</p>		

【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