



研究用試薬

パラフィン包埋切片用

ヒストファイン シンプルステインラット MAX-PO(G)

貯法 : 2-8 保存
包装 : 170 テスト(17mL×1本)
有効期間 : 製造後 1年 6ヶ月

Code : 414331

【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】

アミノ酸ポリマーに、ペルオキシダーゼとFab'にした抗ヤギIgG(動物種:ウサギ)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(pH6.5)にて即時使用可能な濃度に調製済み。

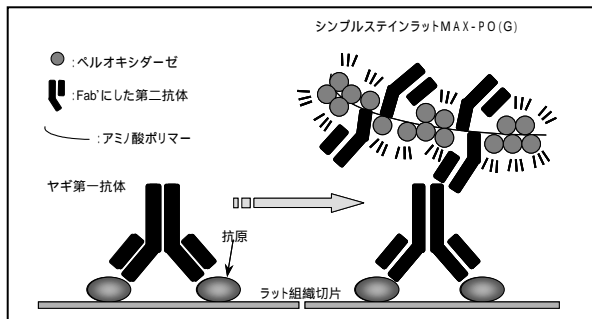
【製法】*

本品は、以下の方法で作製されている。*

1. ウサギにヤギイムノグロブリンを免疫する。*
2. 免疫後、ウサギ血清を採取、その血清より、精製したIgGフラクションを消化し、F(ab)₂を作製する。*
3. 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)₂を精製する。
4. 固相化したラットIgGとラット血清タンパク質による吸収操作を行う。
5. 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)₂を還元して得たFab'を結合させる。
6. 即時使用可能な濃度に調製。*

【用途及び原理】**

ラット組織用免疫組織化学染色試薬。ヤギ第一抗体に用いる。酵素抗体法により、組織中の抗原を検出する。ラット組織または細胞に、まずヤギ第一抗体を反応させ、次に本品を反応させると、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。



注)** 本品が認識するヤギ IgG は、ウシ IgG とその構造の一部が酷似しているため、本品を用いて免疫組織化学染色を行う場合、後述の目的で、ウシ IgG の他、BSA、カゼイン、スキムミルク等、ウシ由来成分を含む試薬を使用した時、試薬に含まれる微量のウシ IgG と本品が交差反応し、組織切片上に非特異染色を呈する場合があります。本品を使用の際は、この点を十分留意の上、試薬対照スライドを併用するなどの対策を講じること。

- ・ 非特異染色の回避目的のブロッキング試薬
- ・ 非特異染色の回避目的も含めた洗浄液(PBS 等に添加)
- ・ 第一抗体の安定を目的とした第一抗体希釈液

【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 - 6 μm に薄切り、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(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

・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
- ・ 染色ドーズ
- ・ 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
K₂HPO₄ 1.50g
KH₂PO₄ 0.20g
精製水 1 L
・ 精製水
- ・ スライドスタンド
- ・ 湿潤箱
- ・ 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)
- ・ ヤギ第一抗体
- ・ 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
- ・ ネガティブコントロール(ヤギ正常血清)
- ・ 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(3 分間ずつ容器を 2 度かえるか、または洗浄ピンを使用する)。

[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ヤギ第一抗体 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、ヤギ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）2 滴を滴下する。
- (4) 常温(15 - 25)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。

3.シンプルステインラット MAX-PO(G)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シンプルステインラット MAX-PO(G) 2 滴をすべてのスライドに滴下する。常温(15 - 25)で30 分間反応させる。
- (3) PBS でよくすすぐ。

4.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 滴を滴下する。常温(15 - 25) 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) 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 枚処理するごとに切り替える。
- (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/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	対策
陽性コントロールスライド及び標本スライドの染色が認められない、あるいは弱い。	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。
	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。
	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。	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。
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。	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。	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。
	自己消化により抗原が破壊されている。	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。
	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設定する。
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。	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。	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。
	非特異結合成分がある。	第一抗体の添加前に 10%ウサギ正常血清で処理する。
	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。	可能ならば、新鮮な組織を包埋する。
	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。
	不十分な抗体の洗浄。	抗体の洗浄を十分に行う。
	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。
	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。
ブロッキング試薬、洗浄液、および第一抗体希釈液の成分にウシ IgG が含まれている。(P1: [用途及び原理]注)参照)	ウシ IgG 不含の溶液を用いるか、試薬対照スライドを併用し、特異染色範囲を特定する。	
反応中に組織切片がスライドからはがれてしまう。	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、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
ヒストファイン シンプルステインラット MAX-PO(G)	414331	170 テスト (17mL × 1 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) 基質緩衝液 (試薬 B) 発色試薬 (試薬 C)		3mL × 1 本 3mL × 1 本 3mL × 1 本

【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

参考(凍結切片を用いて染色を行う場合)

本品は、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、操作方を参考にすること。

通常の染色手順においてバックグラウンド染色が認められる場合、下記のステップにて調整することを推奨する。



【凍結切片を用いて染色を行う場合の注意】

- 凍結切片の作製方法について
組織は、固定組織、未固定組織いずれも使用できる。
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。
- シンプルステインラット MAX-PO(G)の反応時間について
シンプルステインラット MAX-PO(G)は、パラフィン包埋切片用に濃度、反応時間(30分)を設定している。凍結切片で、本製品を30分間反応させ、バックグラウンド染色(非特異染色)が認められた場合には、本製品の反応時間を10 - 30分の間で短くすること(STEP1)。ラットの系統・組織・固定方法により、至適時間が異なるので、十分検討を行うこと。
- 0.2%グルタルアルデヒド溶液の使用について
シンプルステインラット MAX-PO(G)の反応時間を短縮しても、バックグラウンド染色(非特異染色)が認められる場合、0.2%グルタルアルデヒド溶液でのブロッキングにより、バックグラウンド染色(非特異染色)が低下する場合がある(STEP2)。0.2%グルタルアルデヒド溶液の作製方法・使用方法については、下記(操作方法)を参照すること。なお、0.2%グルタルアルデヒド溶液を併用する場合、使用する第一抗体の反応を阻害しないかどうかの確認を行うこと。また、ラットの系統・組織・固定方法により、効果に差があるので、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固定した組織または未固定(新鮮)組織は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。

【固定組織(固定後、凍結・薄切した組織)を用いる場合】

凍結した切片を4 - 6 μm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。

【未固定組織(凍結・薄切後に組織を固定する組織)を用いる場合】

凍結した切片を4 - 6 μm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。その後、4%パラホルムアルデヒド、アセトン、エタノールなどで4 - 10分間、固定し、PBSでよくすすぐ。

操作方法

【必要な試薬、器具】

- ・ P1 記載内容参照のこと。
- ・ 0.2%グルタルアルデヒド溶液(必要な場合)
50%グルタルアルデヒド(SIGMA社：コードG7651)をPBSで0.2%となるように250倍希釈。

【染色手順】

- 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)
注)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。
(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。)
- 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、ヤギ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)2滴を滴下する。
(4) 常温(15 - 25℃)あるいは4℃で反応させる(各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。
- 0.2%グルタルアルデヒド溶液の添加・反応(STEP2)
(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0.2%グルタルアルデヒド溶液2滴を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。
- シンプルステインラット MAX-PO(G)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シンプルステインラット MAX-PO(G)2滴をすべてのスライドに滴下する。常温(15 - 25℃)で30分間反応させる。バックグラウンド染色が認められる場合には10 - 30分の間で短くすること(STEP1)。
(3) PBSでよくすすぐ。
- 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滴を滴下する。常温(15 - 25℃)で5 - 20分間反応させる。
(3) 精製水でよくすすぐ。

【対比染色】

- 対比染色試薬にスライドを浸す。
- 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。

検体標本スライドの準備、検体対照スライドの準備、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。

