



研究用試薬

ヒストファイン

ブロッキング試薬、ビオチン標識第二抗体、ペルオキシダーゼ標識試薬
ヒストファイン SAB-PO (R)

包装：500テスト

コード：414562

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】

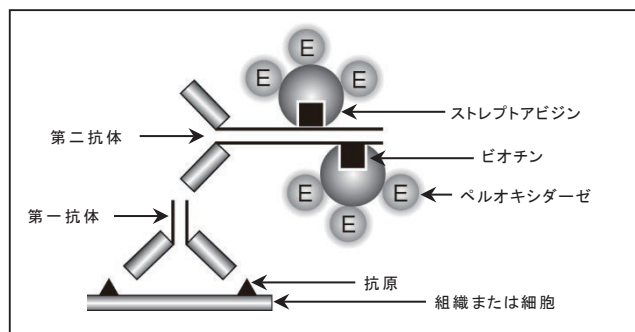
組織や細胞塗抹標本、サイトスピン標本中の抗原同定は、免疫組織学および免疫細胞学的技術によって可能になる。本キットはこの技術を用い、第二抗体にはビオチンを結合、また、ビオチンと高い親和性を示すストレプトアビジンには酵素を標識して、効率的にかつ鋭敏に免疫組織化学染色を行う試薬システムである。特にストレプトアビジンに酵素を直接結合させているのが、本キットのユニークな特長である。

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約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(分子量約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($K_d=10^{-15}$)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、すぐれた感度が得られる。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、次にビオチン標識抗ウサギIgG第二抗体(ビオチン標識抗ウサギIgG抗体(動物種: ヤギ))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酵素試薬(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。



1. 内容

試薬	包装
10%ヤギ正常血清ブロッキング 10%ヤギ正常血清	17mL×3本
ビオチン標識抗ウサギIgG第二抗体 ビオチン標識抗ウサギIgG抗体(動物種: ヤギ)	17mL×3本
ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン酵素試薬 ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン	17mL×3本

2. 使用目的

本キットは、免疫組織化学および免疫細胞化学染色において、ストレプトアビジン-ビオチン(SAB)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 | ・対比染色試薬 |
| ・100%エタノール | ・光学顕微鏡 |
| ・95%エタノール | ・精製水 |
| ・3%過酸化水素加メタノール | ・湿潤箱 |
| (30%過酸化水素水をメタノールで10倍希釈) | ・封入剤 |
| ・リン酸緩衝生理食塩水(PBS)(pH7.6 ± 0.2) | ・タイマー |
| NaCl 7.75g | ・洗浄用容器 |
| K ₂ HPO ₄ 1.50g | |
| KH ₂ PO ₄ 0.20g | 精製水1L |
| ・実験用ワイプ | ・カバーガラス |
| ・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 | ・ネガティブコントロール |
| ・発色用試薬(基質溶液) | ・対比染色試薬 |
| ・抗原賦活化液(必要な場合) | |

【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(3%過酸化水素加メタノール)による処理

- (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）。

2.10%ヤギ正常血清ブロッキング(10%ヤギ正常血清)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10%ヤギ正常血清ブロッキングを1～2滴（約50～100μL）滴下し、常温で10分間反応させる。
- (3)余分な10%ヤギ正常血清ブロッキングを振り払う。

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代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。

4.ビオチン標識抗ウサギIgG第二抗体(ビオチン標識抗ウサギIgG抗体(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ビオチン標識抗ウサギIgG第二抗体を2滴（約100μL）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.ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン酵素試薬(ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン)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ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン酵素試薬を2滴（約100μL）すべてのスライドに滴下する。常温で5分間反応させる。
- (3)PBSでよくすすぐ。

6.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ため、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ため、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
- (11)内因性ビオチン(ビタミンB₇)が多量に存在する場合や加熱による抗原賦活化処理によって内因性ビオチン活性が復活した場合には、バックグラウンド染色の低減を目的として、10%ヤギ正常血清ブロッキングによる処理の前に、内因性アビジン・ビオチンブロッキング処理が必要となる場合がある。処理方法については、内因性アビジン・ビオチンブロッキング用試薬の使用説明書に従うこと。

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.本キット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.本キットを吸い込んだり、眼、口、皮膚、衣類などへの接触を避けること。
- 4.本キットの廃棄の際には、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.本キットは、動物由来成分を含むので、取扱いに注意すること。
- 6.本キットにはアジ化ナトリウムが含まれている。アジ化ナトリウムは水道管に含まれる銅、鉛との反応によって爆発の危険性があるので、多量の水とともに洗い流すこと。
- 7.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) Guesdon JL, et al. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. J Histochem Cytochem. 1979 Aug;27(8):1131-9.