



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) (ヒストステイナー用)

包装: 600テスト コード: 714142

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

本品は、自動染色装置ヒストステイナー用の試薬 ペルオキシダーゼ標識ポリマー試薬である。

【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
	600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)	12mL×1本 110mL×1本

試薬は組織切片(約1cm×1cm)あたり、100μLを設定する。
なお、組織の大きさに応じて200μLまで設定できるよう用意されている。
そのまま用いる。ヒストステイナーにセットする際、110mLのボトルから12mLのバイアルに移しかえて使用する。

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。

【スライドバーコードラベルの印字と貼付】

- ヒストステイナーの操作法に従って各スライドのスライドバーコードラベルを作成する。
- スライドバーコードラベルをスライドのプロスト部分に貼り付ける。
この時、バーコードが切片側にくるように注意する。

○操作方法

【必要な試薬、器具】

- 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)
- 乾燥器 ・タイマー
- 染色ドーゼ
- キシレン ・95%エタノール
- 100%エタノール
- 洗浄用容器 ・洗浄ビン
- PBS(研究用試薬「PBS コード: 415223」を使用することを推奨する。)
- 試験管
- 自動染色装置ヒストステイナーシステム
- スライドバーコードラベル(ヒストステイナー用)
- 試薬ボトル(ヒストステイナー用)
- スライドスタンド ・精製水
- バッファー

- (研究用試薬「PBS(ヒストステイナー用) コード: 715224(10倍濃縮)」を使用することを推奨する。)
- ブロッキング試薬 (3%過酸化水素水)
 - (研究用試薬「過酸化水素水(ヒストステイナー用) コード: 715242」を使用することを推奨する。あるいは、30%過酸化水素水を精製水で10倍に希釈する。)
 - 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
 - カバーガラス ・封入剤
 - 実験用ワイプ ・光学顕微鏡
 - 抗原賦活化液(必要な場合)

【試薬バーコードラベルの印字と貼付】

- ヒストステイナーの操作法に従って試薬バーコードラベルを作成する。
- 試薬バーコードラベルを試薬を入れた試薬ボトルの上部平面部分に貼り付ける。この時、印字した文字が試薬ボトルの開口部側にくるように注意する。

【染色方法の設定】

ヒストステイナーの操作法に従って下記染色方法のプログラムを設定する。
注()内の名称はヒストステイナープログラム内の「プロトコール要素」設定の際の名称である。
※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)。抗原賦活化処理の内、常温でのタンパク質分解酵素処理はヒストステイナーで行うことができるので、必要な場合、第一抗体との反応の前にタンパク質分解酵素処理用試薬(Pretreatment)を追加し、プロトコール設定すること。

- (1)ブロッキング試薬(過酸化水素水)(End.Enz.Block)

5分間
- (2)バッファー(Rinse Buffer)

1回
- (3)第一抗体(Primary Antibody)

30分間
- 検体標本スライド、検体対照(陽性コントロール、陰性コントロール)スライドには第一抗体、試薬対照スライドにはネガティブコントロールを反応させる。
- (4)バッファー(Rinse Buffer)

2回
- (5)ヒストファイン シンプルステインヒトMAX-PO(R)(Labelled Polymer)

30分間
- (6)バッファー(Rinse Buffer)

2回
- (7)発色用試薬(基質溶液)(Substrate)

10分間
- (8)バッファー(Rinse Buffer)

1回
- (9)精製水(Rinse Water)

1回
- 滴下する試薬の用量は、組織切片(約1cm×1cm)あたり、100μLを推奨する。なお、各試薬は、200μLまで設定できるよう用意されている。組織切片の大きさに応じて150μL、200μL、400μLあるいは600μLに設定することが可能である。
- 上記は推奨染色プログラムである。使用する各第一抗体および各発色用試薬の使用説明書に従い、反応時間等の条件を変更することができるが、切片が乾燥すると染色性に影響を及ぼす可能性があるため、反応中に切片が乾燥しない条件で設定すること。

【試薬バーコードラベル】

試薬バーコードラベルを使用する場合は、自動染色装置ヒストステイナーのプログラムにバーコードラベル情報を入力する必要がある。本製品が未登録の場合は、下記データを入力(漢字のみ全角、他半角入力)し、登録すること。

専用ボトルに貼付されているバーコードラベル内の情報

登録するカテゴリ	Labelled Polymer
試薬名	シンプ ルステインヒトMAX-PO(R)
試薬略称 (10文字)	MAXPO-Rr
バーコード	MAXPO-Rr
時間(分)	30

上記以外のヒストステイナー用試薬の試薬バーコードラベル内の情報は、各試薬の使用説明書参照のこと。

【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またはバッファーでよくすすぐ(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)。

【免疫染色の準備・開始】

- (1)ブロッキング試薬、第一抗体、ネガティブコントロール、ヒストファイン シンプルステインヒトMAX-PO(R)、発色用試薬(基質溶液)は試薬ラック(ヒストステイナー用)にセットし、バッファー、精製水は各給液ボトルにセットする。

(2)検体標本スライド、試薬対照スライド、検体対照(陽性コントロール、陰性コントロール)スライドをスライドラック(ヒストステイナー用)にセットする。洗浄ピンにバッファーを入れておき、セット後、すぐに組織が覆われるようにバッファーをかけておく。
注)染色開始までの間に切片が乾燥しないように注意する。バッファーをかけた後、30分以上放置する場合は、30分おきにバッファーを組織が覆われるようにかけること。

(3)ヒストステイナーの操作法に従って染色を開始する。

【免疫染色の終了、対比染色】

- (1)全てのスライドをスライドラック(ヒストステイナー用)から取り出し、流水洗する。

(2)対比染色試薬にスライドを浸す。

(3)流水洗する。

(4)セットした試薬を試薬ラック(ヒストステイナー用)から取り出し、2～8℃で保存する。

【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)染色開始前は、いかなる過程でも切片を乾燥させないようにすること。
なお、バッファーを洗浄ピンに入れておき、スライドラック(ヒストステイナー用)にセットした後すぐに、組織が覆われるようにバッファーをかけておく。その後30分以上放置する場合は、30分おきにバッファーを組織が覆われるようにかけること。

(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)脱パラフィンおよび封入過程で、キシレンがスライドバーコードラベルに接しないように注意する。キシレンがラベルに接すると、印字が消えやすくなる。もしラベルがキシレンで濡れたり、キシレンを取り扱った手袋で触れた場合、完全に乾燥するまでラベルに触れないようにスライドを扱うこと。

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.