



# ヒストファイン マウスステインキット (ヒストステイナー用)

貯 法：2-8℃保存  
包 装：180テスト(12mL×各3本 全9本)  
有効期間：製造後1年6ヶ月

Code : 714321

## 【全般的な注意】

1. 本品は、自動染色装置ヒストステイナー専用試薬である。
2. 研究用としてのみ使用すること。
3. 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。
4. ヒストステイナーおよびその他使用する機器の添付文書および取り扱い説明書をよく読んでから使用すること。
5. 本キットを用いたプログラムで染色する際には、他プログラムと同時に染色せず、本キットのプログラム単独で行うこと。

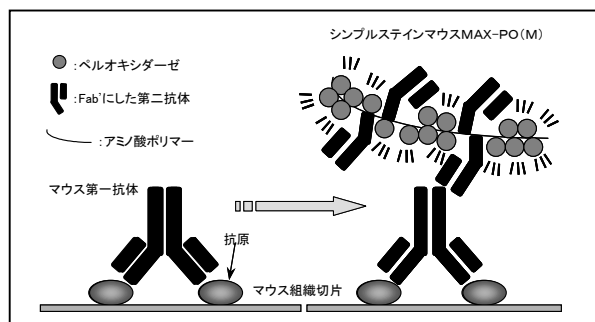
## 【内容および製法】

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ブロッッキング試薬A 液状。即時使用可能な濃度に調製済み。	12mL×3本
②ブロッッキング試薬B 液状。即時使用可能な濃度に調製済み。	12mL×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。	12mL×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。

#### 【スライドバーコードラベルの印字と貼付】

- (1) 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。
- (2) スライドバーコードラベルをスライドのフ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・機器】\*\*

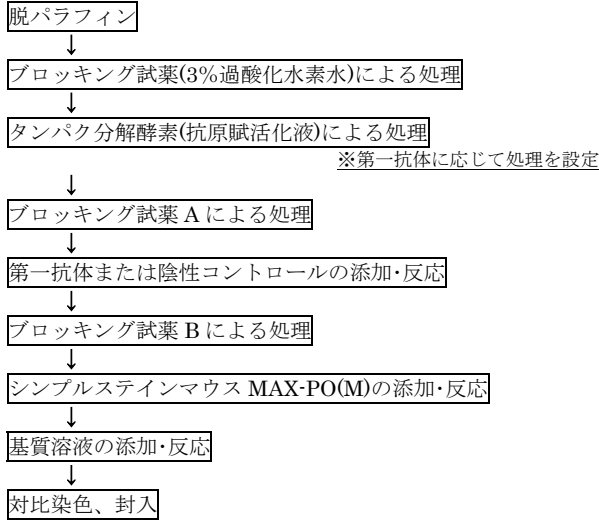
- ・スライドガラス
- ・乾燥器
- ・染色ドーゼ
- ・キシレン
- ・洗浄用容器
- ・PBS(「PBS Code:415223」を使用することを推奨する。)
- ・試験管
- ・自動染色装置ヒストステイナーシステム
- ・スライドバーコードラベル(ヒストステイナー用)(Code:LV-K21004)
- ・試薬ボトル(ヒストステイナー用)(Code:LV-K00029)
- ・スライドスタンド
- ・精製水
- ・バッファー  
(「PBS(ヒストステイナー用) Code:715224(10倍濃縮)」を使用することを推奨する。)
- ・ブロッッキング試薬(3%過酸化水素水)  
(「過酸化水素水(ヒストステイナー用) Code: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。)
- ・マウス第一抗体
- ・ネガティブコントロール(マウス正常血清)
- ・基質溶液  
(「DAB 基質キット(ヒストステイナー用)Code:725191」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
- ・洗浄ピン
- ・封入剤(非水溶性永久封入剤)
- ・光学顕微鏡

### 【試薬バーコードラベルの印字と貼付】

- (1) ヒストステイナー専用試薬以外の試薬を調製する場合、ヒストステイナーの操作方法に従って、試薬バーコードラベルを作成する。
- (2) 試薬バーコードラベルを、ヒストステイナー専用試薬以外の各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】

#### ○フローチャート



#### ○ヒストステイナーのプロトコール設定\*

ヒストステイナーの操作方法に従って下記染色方法のプログラムを設定する。本プログラム単独で染色を行うこと。また、必要な場合には、ブロッキング試薬Aとの反応の前に抗原賦活化液(Pretreatment)処理を追加すること。

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。

- |   |       |
|---|-------|
| (1) ブロッキング試薬(3%過酸化水素水)(End.Enz.Block)                                   | 5 分間  |
| (2) バッファー(Rinse Buffer)   | 1 回   |
| (3) ブロッキング試薬 A(Protein Block)   | 30 分間 |
| (4) バッファー(Rinse Buffer)   | 1 回   |
| (5) 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。 |       |
| (6) バッファー(Rinse Buffer)   | 2 回   |
| (7) ブロッキング試薬 B(Protein Block)   | 10 分間 |
| (8) バッファー(Rinse Buffer)   | 1 回   |
| (9) シンプルステインマウス MAX-PO(M) (Labelled Polymer)                            | 10 分間 |
| (10) バッファー(Rinse Buffer)  | 2 回   |
| (11) 基質溶液(Substrate)  | 10 分間 |
| (12) バッファー(Rinse Buffer)  | 1 回   |
| (13) 精製水(Rinse Water)   | 1 回   |

滴下する試薬の用量は、スライドあたり 200 $\mu$ L を推奨する。ただし、組織切片の大きさに応じて 100 $\mu$ L、150 $\mu$ L、400 $\mu$ L あるいは 600 $\mu$ L に設定することが可能である。

#### 【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、または洗浄ビンを使用する)。

### 【免疫染色の準備・開始】

- (1) ブロッキング試薬、抗原賦活化液(必要な場合)、第一抗体、ネガティブコントロール、ブロッキング試薬A、ブロッキング試薬B、シンプルステインマウスMAX-PO(M)、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。洗浄ビ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方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。
- (2) 対比染色試薬にスライドを浸す。
- (3) 流水洗す。
- (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、基質溶液以外の試薬は 2-8 $^{\circ}$ C で保存する。
- (5) 基質溶液専用試薬ボトルに残った基質溶液は廃棄し、ボトル内を精製水で洗浄した後、完全に乾かして再利用する。  
注) 基質溶液の使用については、「DAB 基質キット(ヒストステイナー用)Code : 725191」の使用説明書内記載の 2.基質溶液の調製を参照すること。

### 【封入】

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) 全ての試薬は使用前に常温(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、バッファを洗浄ビンに入れておき、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 分おきにバッファを組織が覆われるようにかけること。
- (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℃以上には上げてはならない。
- (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) 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。
- (8) 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晩処理すること。

## 【貯蔵方法・有効期間】

貯蔵方法：2-8℃で保存  
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 (ヒストステイナー用)	714321	180 テスト
ブロッキング試薬 A		12mL×3 本
ブロッキング試薬 B シンプルステインマウス MAX-PO(M)		12mL×3 本 12mL×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 (ヒストステイナー用)	725191	600 テスト
発色基質 (試薬 A)		3mL×2 本
基質緩衝液 (試薬 B)		3mL×2 本
発色試薬 (試薬 C) 基質溶液用専用試薬ボトル (空ボトル)		3mL×2 本 2 本

## 【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	Protein Block
試薬名	ブロッキング試薬 A
試薬略称 (10 文字)	M0-M1-P0
バーコード	M0-M1-P0
時間(分)	30

登録するカテゴリ	Protein Block
試薬名	ブロッキング試薬 B
試薬略称 (10 文字)	M0-M2-P0
バーコード	M0-M2-P0
時間(分)	10

登録するカテゴリ	Labelled Polymer
試薬名	シンプルステインマウス MAX-PO(M)
試薬略称 (10 文字)	M0-M3-P0
バーコード	M0-M3-P0
時間(分)	10

問合せ先、製造販売元、販売元は次頁に記載。

## 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。	①切片が乾燥している。	①切片を湿潤させた後は、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設定する。
○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。
	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。	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。	①ブロッキング試薬 (3%過酸化水素水) による指定された処理を設定する。または、設定処理時間を 5 分から 10 分間に延長する。
	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 による指定された処理を設定する。
	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抗体の洗浄の回数を増やす。
	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。
	⑦シンプルステインマウス MAX-PO(M) の濃度が濃い。	⑦シンプルステインマウス MAX-PO(M) を、ヒストステイナーにセットする直前に、PBS または TBS を用いて 2-4 倍に希釈する。プログラム終了後、希釈後の溶液は保存せず廃棄する。また、本対策により特異染色の強度が低下する場合は、第一抗体の濃度を上げる。
○反応中に組織切片がスライドからはがれてしまう。	①スライドへの切片の貼り付けが不十分。	①0.02% poly-L-lysine、シランなどの組織切片用接着剤を使用する。

【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