

研究用試薬

ヒストファイン

 ISH プローブ
EBER-CISH プローブ(AT 用)

包装 : 20 テスト(3.2mL)

Code : AT1109-1

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AT用の試薬 ISH プローブである。

■概要

Epstein-Barr virus (EBV)はγヘルペスウイルスに分類される二本鎖 DNA ウイルスで⁽¹⁾、世界人口の90%以上がEBVに既感染であると言われている⁽²⁾。EBVは上皮細胞やリンパ系細胞に感染し⁽¹⁾、溶解感染と潜伏感染の2つの感染様式をもつが⁽²⁾、このうち潜伏感染状態が発がんに関与しており⁽³⁾、EBV関連がんにはバーキットリンパ腫、ホジキンリンパ腫、胃癌、上咽頭癌などがある⁽⁴⁾。潜伏感染状態においては、EBER(Epstein-Barr virus-encoded small RNAs(EBER-1及びEBER-2))と呼ばれる non-coding RNAを豊富に産生しているため⁽¹⁾⁽³⁾⁽⁵⁾、Chromogenic *in situ* ハイブリダイゼーション(CISH)法を用いたEBERの核染色の検出は、EBV潜伏感染のマーカーとしてEBV感染関連疾患の判別に有用である⁽⁶⁾。

注) EBERが発現している細胞では、核の他に細胞質にも弱～中程度の染色がみられることがある。

1. 内容

ISH プローブ・・・EBER-CISH プローブ

液状。

即時使用可能な溶液に調製済。

1バイアル中に3.2mLを含む。

2. 使用目的

組織・細胞中のEBERの検出。

3. 使用方法

ホルマリン固定パラフィン包埋切片のCISHに使用するISHプローブである。

1) 他の試薬とともに試薬ラック(AT用)にセットし、染色を開始する。

2) 染色終了後、すみやかに2-8℃に保存する。

※詳細は後述の〈EBER CISH 操作説明〉を参照してください。

4. 染色方法の設定

《タイプ:CISH》 ISHプローブ試薬名:EBER probe

プロトコル名	TR	温度(℃)	タンパク質分解酵素処理	時間(分)	温度(℃)
EBER CISH	TRpH6-AT	80	Pepsin-AT	5	30

※上述の染色条件で良好な染色が得られない場合は、4ページ目の【妨害物質と問題対策】や■参考を参照してください。

5. 貯法及び使用上の注意

- 2-8℃保存。
- 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。
- 使用後は速やかに冷蔵保存すること。
- 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。

6. 取扱い上(危険防止)の注意

- 使用期限の過ぎた試薬は使用しないこと。
- 本品に関する化学物質の安全情報は安全データシートを参照すること。
- 本品を吸い込んだり、眼、口、皮膚、衣類等への接触を避けること。
- 本品の廃棄の際には、各施設や地域及び国のルールに従い、適切に廃棄すること。
- ヒト由来の検体は、感染の恐れがあるので適切な取扱い及び廃棄法を用いるとともに、*in situ* ハイブリダイゼーション(ISH)法を施行するに際し、関連技術及び操作法に充分習熟しておかなければならない。

■研究用としてのみ使用すること。

〈EBER CISH 操作説明〉

【測定原理】

in situ ハイブリダイゼーション(ISH)法は、組織又は細胞における特定の核酸配列に相補的なオリゴヌクレオチドプローブをハイブリダイゼーションすることで、その局在を検出する技術である。ISH 法の一つである Chromogenic *in situ* ハイブリダイゼーション(CISH)法は、ハプテン等で標識されたプローブをハイブリダイゼーションさせ、その後酵素を標識した抗ハプテン抗体等を反応し、その酵素活性を利用して色素原(Chromogen)を発色させる。光学顕微鏡下で組織形態と標的核酸の局在を同時に観察可能にする染色法である。

EBER CISH の染色操作は、自動染色装置(ヒストステイナーAT及びそれと同等の装置)を用いて行う。初めにホルマリン固定パラフィン包埋された組織又は細胞中の標的核酸配列に相補的な ISH プローブ*1 をハイブリダイゼーションさせる。次に酵素と抗体を結合させたアミノ酸ポリマー (CISH 検出試薬 A**2)を反応させ、さらに架橋試薬 (CISH 検出試薬 B**2)を反応させた後、抗体と酵素を結合させたアミノ酸ポリマー (CISH 検出試薬 C**2)を反応させる。その結果、標的核酸・プローブ・CISH 検出試薬 A・B・C 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と基質を利用して DAB 沈殿物を生成し呈色させる。EBER CISH では、標的核酸である EBER を可視化することで、光学顕微鏡により EBER 発現の有無を確認することができる。

※1 EBER-CISH プローブ(AT 用)

※2 BRIGHTEST-CISH(AT 用) 構成試薬

CISH 検出試薬 A : ペルオキシダーゼ標識抗ジゴキシゲンポリクローナル抗体(Fab) (動物種 : ヤギ)

CISH 検出試薬 B : 抗ペルオキシダーゼモノクローナル抗体(動物種 : マウス)

CISH 検出試薬 C : ペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG ポリクローナル抗体(Fab)(動物種 : ヤギ)

【操作上の注意】

固定不良の場合、自己融解や核酸の断片化、修飾が生じることがあるので固定液や固定時間はゲノム研究用・診療用病理組織検体取扱規程等を遵守すること。

【用法・用量(操作方法)】

○検体の準備

腫瘍を含む組織を用いて、ホルマリン固定パラフィン包埋(Formalin-Fixed Paraffin-Embedded : FFPE) ブロックを作製する。組織形態や標的核酸を維持した最適固定を得るため、できるだけ新鮮な組織切片の使用と、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

ただし、標的核酸が RNA の場合は、20%(緩衝)ホルマリンを用いるなどして、より十分な固定を行うほうが良好な結果が得られる場合がある⁽⁷⁾。

固定後、水洗い、エタノールに浸して脱水、キシレンに浸して脱アルコールを行い、パラフィン浸透をしてパラフィン包埋ブロックを作製する。

○切片及び標本の準備

【パラフィン包埋切片】

切片を 3-6 μm に薄切し、poly-L-lysine 又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、プローブの代わりに陰性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】

(1)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、あらかじめ標的核酸が存在することを確認している組織、細胞スライドを準備する。

(2)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、あらかじめ標的核酸が存在しないことを確認している組織、細胞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。

【スライドラベルの印字と貼付】

(1)ヒストステイナーAT の取扱説明書に従って各スライドのスライドラベルを作成する。

(2)スライドラベルをスライドのフロスト部分に貼り付ける。

○操作方法

【必要な試薬、器具・機器】

- ・スライドガラス(poly-L-lysine 又はシランコーティングスライド)
- ・恒温器
 - ・タイマー
- ・キシレン、アルコール(透徹用)
- ・洗浄用容器
- ・自動染色装置ヒストステイナーAT
- ・スライドラベル(AT 用)
- ・スライドスタンド
 - ・精製水
- ・陰性コントロール試薬
- ・封入剤(非水溶性封入剤)
- ・カバーガラス
 - ・光学顕微鏡

品名	コード	包装
脱パラフィン用溶液 Dewax-1(AT 用)	AT1532-1	500 テスト (12mL×10 本)
ブロッキング試薬 過酸化水素水(AT 用)	AT1524-1	50 テスト (11mL×1 本)
抗原賦活化液 TR-pH6(AT 用)	AT1535-1	50 テスト (12.5mL×2 本)
タンパク質分解酵素処理液 ペプシン-ISH(AT 用)	AT1542-2	40 テスト (1.3mL×4 本)
ISH プローブ EBER-CISH プローブ(AT 用)	AT1109-1	20 テスト (3.2mL×1 本)
BRIGHTEST-CISH(AT 用) CISH 検出試薬 A CISH 検出試薬 B CISH 検出試薬 C	AT1453-2	50 テスト 6.5mL×1 本 6.5mL×1 本 6.5mL×1 本
DAB 基質キット OB(AT 用) 発色基質 発色試薬	AT1541-1	500 テスト 11mL×5 本 11mL×5 本
DAB 基質キット(AT 用) 発色基質 発色試薬 目盛り付き試験管 基質溶液用ボトル	AT2536-1	500 テスト 試薬 A 2.7mL×4 本 試薬 B 54mL×4 本 1 本 2 本
対比染色試薬 マイヤー-ヘマトキシリン溶液II(AT 用)	AT1540-1	300 テスト (13mL×3 本)
洗浄液 TBS(AT 用)	AT1537-1	1L(10L 用)×1 本

【試薬の調製方法】

・ 基質溶液の調製方法

DAB 基質キット OB(AT 用)(コード: AT1541-1)を用いる場合は、調製不要である。DAB 基質キット(AT 用)(コード: AT2536-1)を用いる場合は、構成試薬である発色基質と発色試薬を用いて、基質溶液を調製する。付属の目盛り付き試験管に、発色試薬 1mL あたり発色基質 2 滴(約 40 μ L)の割合で加え、泡立たないように注意して混合する。取扱いに注意し、静かに基質溶液用ボトルに移す。遮光して冷蔵(2-8 $^{\circ}$ C)保存し、調製日から 5 日以内に使用する。

注 1) 調製日の異なる基質溶液は、混合して使用しないこと。

注 2) 目盛り付き試験管は、精製水で洗浄した後、完全に乾燥して再利用する。

・ 洗浄液の調製方法

精製水で 10 倍に希釈する。

その他の試薬はそのまま用いる。

【RFID タグの登録の確認又は登録】

(1)ヒストステイナーAT を用いて染色するには、専用の試薬ボトルに付属している RFID タグ内に試薬情報が登録されている必要がある。試薬情報が登録されていることを確認する。登録がない場合、ヒストステイナーAT の取扱説明書に従って登録を行うこと。

【染色方法の設定】

(1)染色操作は、自動染色装置(ヒストステイナーAT及びそれと同等の装置)を用いて行う。自動染色装置の詳細な設定方法は、各装置の取扱説明書に従う。

【EBER CISH の準備・開始】

- (1)脱パラフィン用溶液、ブロッキング試薬、抗原賦活化液、タンパク質分解酵素処理液、ISHプローブ、陰性コントロール、CISH検出試薬A、CISH検出試薬B、CISH検出試薬C、DAB基質キット OB(AT用)を用いる場合は発色基質・発色試薬又はDAB基質キット(AT用)を用いる場合は調製した基質溶液、対比染色試薬、洗浄液をセットする。
- (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)スライドをセットする。
- (3)ヒストステイナーATの取扱説明書に従って染色を開始する。

【EBER CISH 染色】

- (1)脱パラフィン用溶液を各スライドに加え反応させる。その後、洗浄液で洗浄する。
- (2)ブロッキング試薬を各スライドに加え反応させる。その後、洗浄液で洗浄する。
- (3)抗原賦活化液を各スライドに加え反応させる。その後、洗浄液で洗浄する。
- (4)タンパク質分解酵素処理液を各スライドに加え反応させる。その後、洗浄液で洗浄する。
- (5)ISH プローブを試薬対照スライド以外の各スライドに加え、試薬対照スライドには、プローブの代わりに陰性コントロールを加え反応させる。その後、洗浄液で洗浄する。
- (6)CISH 検出試薬 A を各スライドに加え反応させる。その後、洗浄液で洗浄する。
- (7)CISH 検出試薬 B を各スライドに加え反応させる。その後、洗浄液で洗浄する。
- (8)CISH 検出試薬 C を各スライドに加え反応させる。その後、洗浄液で洗浄する。
- (9)発色基質・発色試薬又は基質溶液を各スライドに加え反応させる。その後、洗浄液で洗浄する。
- (10)対比染色試薬を各スライドに加え反応させる。その後、洗浄液で洗浄する。

【EBER CISH 染色の終了】

- (1)全てのスライドをモジュールから取り出し、流水洗する。
- (2)セットした試薬は、ボトルキャップをして試薬ラックから取り出し 2-8 $^{\circ}$ Cで保存する。

【封入】

(1)脱水、キシレンによる透徹後、非水溶性封入剤で封入し、カバーガラスをかける。

【検鏡】

(1)光学顕微鏡で観察する。

【使用上又は取扱い上の注意】

1.取扱い上(危険防止)の注意

- (1)検体組織には、HIV、HBV などの感染のおそれがあるので、取扱いには十分注意すること。
- (2)染色操作の際には、感染の危険を避けるため、使い捨て手袋等を着用すること。
- (3)試薬が皮膚などへ接触しないようにすること。
- (4)ペプシン-ISH(AT 用)や BRIGHTEST-CISH(AT 用)の CISH 検出試薬 B にはアジ化ナトリウムが含まれているので、取扱いには十分注意すること。
- (5)発色基質である 3,3'-ジアミノベンジジン・4HCl は変異原性が認められているので、取扱いには十分注意すること。
- (6)発色試薬には過酸化水素水が含まれているので、取扱いには十分注意すること。

2.使用上の注意

- (1)すべての試薬は 2-8 $^{\circ}$ Cで保存すること。
- (2)使用期限の過ぎた試薬は使用しないこと。
- (3)異なるロットの試薬や他製品の試薬を混ぜて使用しないこと。
- (4)DAB 基質キット(AT 用)を用いる場合は調製日の異なる基質溶液を混ぜて使用しないこと。

3.廃棄上の注意

- (1)ペプシン-ISH(AT 用)や BRIGHTEST-CISH(AT 用)の CISH 検出試薬 B にはアジ化ナトリウムが含まれており、使用後は一般廃液ボトルへ蓄積される。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、蓄積された試薬は多量の水とともに配水管へ流すこと。
- (2)発色基質や調製した基質溶液には 3,3'-ジアミノベンジジンが含まれており、使用後は有害廃液ボトルへ蓄積される。蓄積された試薬は各施設のルールに従い、適切に処理すること。
- (3)検体組織に接触した器具・試薬及び試薬容器等は感染の危険性があるので、滅菌処理や消毒を行った後、廃棄物の処理及び清掃に関する法律、水質汚濁防止法等の規定に従って処理すること。
- (4)試薬が飛散した場合は、アルコールスプレーなどを用いてふき取りと消毒を行うこと。

【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特異染色が認められない、あるいは特異染色の強度が弱い。	①チャンバー劣化が原因で試薬伸展や試薬吸引が不十分となり、切片が乾燥したり、試薬反応に問題が生じている。	・劣化したチャンバーは廃棄し、正常なチャンバーを使用する。
	②前処理が不十分である。	・1 ページ目の 4. 染色方法の設定を変更する。 ■ 「TR」の「温度(°C)」を上げる。 ■ 「タンパク質分解酵素処理」の「温度(°C)」を上げる。 ■ 「タンパク質分解酵素処理」の「時間(分)」を長くする。
○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固定や包埋過程で核酸の断片化や化学修飾、マスキングが生じている。	・固定液や固定時間を変更する。 ・指定された前処理を設定する、又は設定されているかを確認する。
	②自己融解により標的核酸が破壊されている。	・可能な限り、生検あるいは外科組織を使用する。
○陽性コントロールスライド及び標本スライドの特異染色の強度が強すぎる。	①前処理が強い。	・1 ページ目の 4. 染色方法の設定を変更する。 ■ 「TR」の「温度(°C)」を下げる。 ■ 「タンパク質分解酵素処理」の「温度(°C)」を下げる。
○全ての染色スライドのバックグラウンドが強く(弱く)染色される。	①自己融解の結果、組織液に遊離した核酸断片が存在している。	・可能な限り、新鮮な組織を包埋する。
	②チャンバー劣化が原因で洗浄液の伸展や洗浄液吸引が不十分となり、染色工程の洗浄が不十分になる。	・劣化したチャンバーは廃棄し、正常なチャンバーを使用する。
	③室内温度が高すぎて、タンパク質分解酵素処理が促進され過消化となっている。	・常温 (15-25°C) にコントロールする。
	④前処理が強い。	・1 ページ目の 4. 染色方法の設定を変更する。 ■ 「TR」の「温度(°C)」を下げる。 ■ 「タンパク質分解酵素処理」の「温度(°C)」を下げる。
○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である。	・0.02%poly-L-lysine、シラン等の組織切片用接着剤を使用する。

【参考文献】

- 1) Khan G et al. Epstein Barr virus (EBV) encoded small RNAs: targets for detection by in situ hybridisation with oligonucleotide probes. J Clin Pathol. 1992 Jul;45(7):616-20.
- 2) 佐藤好隆. Epstein-Barr ウイルス溶解感染における細胞内環境変化に関する研究. ウイルス. 2020;70(1):83-90.
- 3) Iwakiri D. Epstein-Barr Virus-Encoded RNAs: Key Molecules in Viral Pathogenesis. Cancers (Basel). 2014 Aug 6;6(3):1615-30.
- 4) Kim DN et al. Characterization of naturally Epstein-Barr virus-infected gastric carcinoma cell line YCCEL1. J Gen Virol. 2013 Mar;94(Pt 3):497-506.
- 5) Ahmed W et al. Epstein-Barr virus-encoded small RNAs (EBERs) are present in fractions related to exosomes released by EBV-transformed cells. PLoS One. 2014 Jun 4;9(6):e99163.
- 6) Gulley ML. Molecular diagnosis of Epstein-Barr virus-related diseases. J Mol Diagn. 2001 Feb;3(1):1-10.
- 7) 日本病理学会 編. ゲノム研究用・診療用病理組織検体取扱い規程. 羊土社. 2019.

■参考：組織の固定状況等により、染色条件を変更することで良好な染色が得られる場合がある。
ただし、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。

染色条件の検討についてご不明な点等ございましたら、弊社までお問い合わせください。

【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