

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

Detection System for Mouse sections

Histostar™ mouse (Rat)

Immunostaining Reagent, Anti-Rat

CODE No. 8463, 8464

Histostar™ mouse (Rb)

Immunostaining Reagent, Anti-Rabbit

CODE No. 8470, 8471

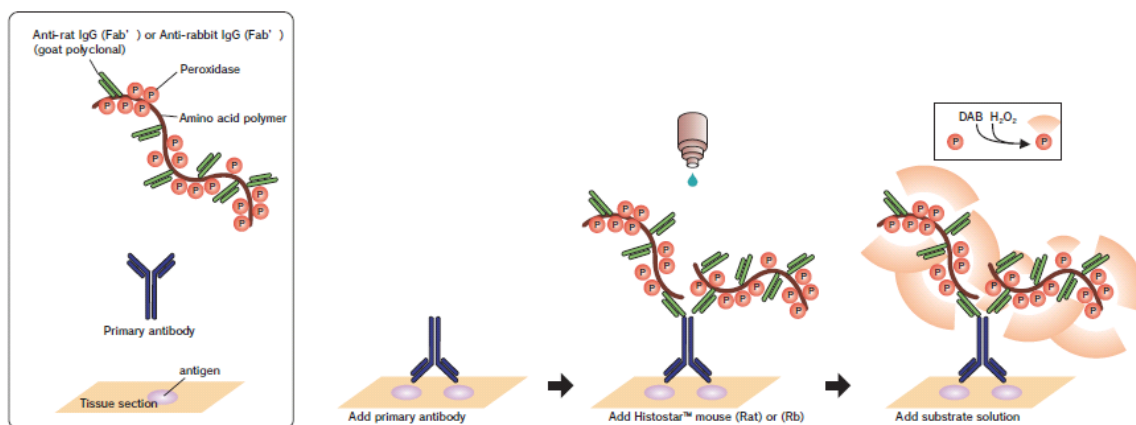
1. INTRODUCTION

Immunohistochemistry (IHC) is an efficient means to understand antigens distribution and localization in cells or tissue sections under the microscope. IHC is widely used in clinical diagnosis of disease and basic research purposes. IHC uses monoclonal or polyclonal antibodies to determine the tissue distribution of an antigen of interest. The site of antibody binding is visualized by a marker such as fluorescent dye, enzyme, radioactive element or colloidal gold that is directly linked to the primary antibody or to an appropriate secondary antibody. In immunoenzyme technique, frequently used streptavidin-biotin complex (SAB) methods or avidin-biotin complex (ABC) method, which need additional two steps containing both Biotinylated secondary antibody reaction and peroxidase labeled streptavidin reaction after first antibody reaction.

Histostar™ is a two-step IHC staining reagent. This reagent is based on a horseradish peroxidase (HRP) labeled polymer which is conjugated with secondary antibodies. It increases the number of available HRP at the antigenic site, thus increasing their reactivity with the chromogen. **Histostar™** is an extremely sensitive reagent and save time. Because **Histostar™** does not contain avidin and biotin, nonspecific staining as a result of endogenous biotin is eliminated.

2. PRINCIPLE

The antigen / antibody / **Histostar™** complex can be prepared by allowing the reagent to react with a primary antibody bound to the antigen on tissue section. The enzymatic activity of this complex results in a colored dependent, thus staining the antigen site.



3. PRESENTATION

Liquid. Ready for use.

Histostar™ is stored in MOPS (3-Morpholinopropanesulfonic acid) buffer (pH 6.5) containing stabilizer and antibacterial agent.

Histostar™ mouse (Rat) (Immunostaining Reagent, Anti-Rat) is the labeled polymer prepared by combining amino acid polymers with peroxidase and goat anti-Rat IgG which is reduced to Fab'. IgG fraction purified from immunized goat serum is digested to prepare F(ab')₂. Antigen-specific F(ab')₂ is affinity-purified with the antigen. Solid-phase absorption is carried out with mouse IgG and mouse serum protein. Peroxidase-labeled amino acid polymer is conjugated to Fab' obtained by reducing F(ab')₂.

Histostar™ mouse (Rb) (Immunostaining Reagent, Anti-Rabbit) is the labeled polymer prepared by combining amino acid polymers with peroxidase and goat anti-Rabbit IgG which are reduced to Fab'. IgG fraction purified from immunized goat serum is digested to prepare F(ab')₂. Antigen-specific F(ab')₂ is affinity-purified with the antigen. Solid-phase absorption is carried out with mouse IgG, mouse serum protein and human serum protein. Peroxidase-labeled amino acid polymer is conjugated to Fab' obtained by reducing F(ab')₂.

Products name	Code no.	Quantity
Histostar™ mouse (Rat)	8463	15 mL × 1 vial (150 tests)
	8464	15 mL × 3 vials (450 tests)
Histostar™ mouse (Rb)	8470	15 mL × 1 vial (150 tests)
	8471	15 mL × 3 vials (450 tests)

4. STORAGE and STABILITY

Histostar™ reagents are to be stored in a dark place at 2-8°C. Do not freeze. The expiration date is printed on the reagent vial.

5. INTENDED USE

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

Histostar™ mouse (Rat) and **Histostar™** mouse (Rb) are designed to allow Immunohistochemical studies using a user-supplied Rat primary antibody or Rabbit primary antibody respectively. **Histostar™** reagents are available for formalin fixed paraffin-embedded mouse tissue sections.

6. PRECAUTION WHILE USING OR HANDLING

1. Before using this reagent, please read these instructions.
2. Do not use reagents after the expiration date.
3. Specimens, before and after fixation, and all other materials exposed to them, should be handled like biohazardous materials with proper precautions.
4. Inhalation or ingestion of the highly allergic fixative formaldehyde is harmful. Wear protective mask. If swallowed, induce vomiting. If skin or eye contact occurs, wash thoroughly with water.
5. Organic reagents are flammable. Do not use near open flame.
6. Never pipette reagents by mouth and avoid their contact with skin, mucous membranes and clothes.
7. Avoid microbial contamination of reagents as incorrect result may occur.
8. Avoid splashing of reagents or generation of aerosols.
9. For research use only. Not for diagnostic use.

7. STAINING PROCEDURES

■ Reagents and Materials required but not provided

- Primary antibody
- Xylene
- 100% ethanol
- 95% ethanol
- Counter staining solution
- 3% solution of hydrogen peroxide in PBS or 0.3% hydrogen peroxide in methanol
- Phosphate buffered saline (PBS)
- Adhesive for tissue section (0.02% poly-L-Lysine, silane or the like)
- Chromogen/substrate reagent
Histostar™ DAB substrate solution (MBL; Code no. 8469) is recommended.
- Negative control reagent
- Cover slips
- Light microscope
- Distilled water
- Humidified chamber for slide incubation
- Mounting media
- Timer
- Staining racks or Coplin Jars
- Absorbent wipes

■ Specimen preparation

[Paraffin-embedded tissue sections]

Specimens may undergo histological disintegration or antigenic denaturation when subjected to highly concentrated fixative or prolonged fixing. Thus, in order to obtain an optimal fixing, maintaining tissue morphology and antigen activity, tissues which are as fresh as possible and small in size (about 1cm x 1cm x 0.5cm) should be used. The fixatives as shown are recommended.

Fixing reagent	Fixing time
10% formalin or buffered formalin	24 – 48 hours
20% formalin	12 – 24 hours

[Frozen tissue sections]

Specimens are embedded in compounds (like OCT compound) and snap-frozen in n-hexane cooled in dry ice-acetone or liquid nitrogen.

■ Section preparation

[Paraffin embedded tissue sections]

The cut sections should be 3-6 μm and placed on slides. When further treatments are to be done such as Antigen Recovery, Heat-Induced Epitope Retrieval (HIER) or trypsin treatment, the glass slides should be coated with an adhesive like 0.02% poly-L-lysine or silane for tissue sections.

[Frozen tissue sections]

The Cryostat sections are mounted on an adhesive (like 0.02% poly-L-Lysine)-coated slides and air-dried well. The sections are fixed in 100% acetone for 10 minutes at room temperature or 4% paraformaldehyde-PBS solution for 10 minutes at 4°C and then stained.

[Control slides]

A positive control slide, negative control slide and reagent control slide are needed and processed in the same way as the unknown specimen slide to interpret staining results.

Protocol

■ Deparaffinization and Rehydration

1. Immerse the slides in Xylene 3 times for 3-5 minutes each.
2. Immerse the slides in 100% Ethanol 2 times for 3-5 minutes each.
3. Immerse the slides in 95% Ethanol 2 times for 3-5 minutes each.
4. Immerse the slides in PBS 3 times for 3-5 minutes each.

■ Recommended Staining Procedures

1. Wipe areas around the sections on the slides carefully to remove excess solution.
2. Immerse each section in 3% H₂O₂ for 10 minutes or 0.3% H₂O₂ in Methanol for 30 minutes at room temperature to block endogenous peroxidase activity.
3. Wash the slides 3 times in PBS for 5 minutes each.
4. Remove the slides from PBS, wipe gently around each section and cover tissues with Blocking reagent (e.g. 20 mM HEPES, pH 7.4, 1% BSA, 135 mM NaCl) for 10-15 minutes to block non-specific staining. Do not wash.
5. Tip off the blocking buffer, wipe gently around each section and cover tissues with optimally diluted primary antibody or negative control reagent. Incubate them sections at room temperature or 4°C.(Follow the instructions for dilute concentration and incubation time designated in the package insert of primary antibody. The optimal concentration and incubation time of primary antibodies should be determined by the investigation. In some cases, further dilution of primary antibodies may be required to prevent overstaining.)
6. Wash the slides 3 times in PBS for 5 minutes each.
7. Wipe gently around each section and cover tissues with **HistoStar**TM reagent. Incubate for 30 minutes at room temperature.
8. Wash the slides 3 times in PBS for 5 minutes each.
9. Visualize by reacting for 5-20 minutes with **HistoStar**TM DAB substrate solution or 150 mL PBS containing 7.5 mg DAB, 40 µL of 30% H₂O₂. *DAB is a suspect carcinogen and must be handled with care. Always wear gloves.
10. Wash the slides in water for 5 minutes.
11. Counter stain in hematoxylin for 1 minute, wash the slides 3 times in water for 5 minutes each, and then immerse the slides in PBS for 5 minutes. Dehydrate by immersing in Ethanol 3 times for 3 minutes each, followed by immersing in Xylene 3 times for 3 minutes each.
12. Now ready for mounting.

■ Interpretation of results

- Microscopic observation

The slides are examined under a light microscope for a positive reaction. It is necessary to make comparison with three types of the control slides for interpreting staining results.

- Positive control slide

A specimen containing the target antigen which is processed in the same way as the unknown specimen.

- Negative control slide

A specimen not containing the target antigen which is processed in the same way as the unknown specimen.

- Reagent control slide

The control specimen is used and processed in the same way as the test specimen except that negative control reagent is used instead of primary antibody. If the slide is stained, it is probably due to non-specific reaction by non-specific protein binding.

8. LIMITATION

Tissue staining is dependent on the handling and processing of the tissue prior to staining. Improper fixation, freezing, thawing, washing, drying, heating, or sectioning may produce artifacts or false-negative results.

Results will not be optimal if old or unbuffered fixatives are used, or excessively heated during embedding or during attachment of sections to slides.

False-Positive results may be seen due to nonspecific binding of proteins. Although **Histostar™** does not require the use of blocking reagent separately, in some cases the application of blocking reagent containing an irrelevant protein, prior to incubation with the primary antibody, may be useful for reducing the background.

9. CONDITION FOR USE

Histostar™ is designed for research use only and is not intended for therapeutic or diagnostic purposes. MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES sales agents and distributors will take no responsibility for **Histostar™** when used in a way which directly or indirectly violates local regulations or patents. Neither MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES nor its sales agents can be held responsible for any patent infringement which may occur as a result of improper use of the product.

10. TROUBLE SHOOTING

Problem	Possible cause	Solution
<input type="checkbox"/> No staining or only weak staining results on the positive control slide and the unknown specimen slide.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Drying-out of specimens during staining prior to addition of the reagents. 2. The embedding agent is not suitable, or paraffin is not thoroughly removed from paraffin-embedded sections. 3. Any trace amount of sodium azide present in the buffer inactivates the peroxidase, making the staining impossible. 4. Inadequate incubation of the enzyme and antibody. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Never allow the tissue to dry out. 2. Select a suitable embedding agent or remove paraffin thoroughly from sections embedded 2. Change xylene or ethanol as the case may be. 3. Use sodium azide free buffer solution. 3. Change buffer solution. 4. Change stale chromogen/substrate reagent. 4. Blot off excess solution thoroughly at each stage. 4. Provide sufficient time for reaction with antibody. In particular, primary antibody should be incubated for the time period specified in the insert.
<input type="checkbox"/> The unknown specimen slide is not stained while the positive control slide is stained.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Antigen is denatured or masked during fixing or embedding process. 2. Antigen is decomposed by autolysis. 3. Less antigen is present in the sections. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Some antigens are sensitive to fixation or embedding. So use less potent fixative and decrease the fixing time. 1. The pretreatment is required for some tissues, in order to reveal the antigen, such as Antigen Recovery, Heat-Induced Epitope Retrieval (HIER) or trypsin treatment. 2. Use tissues obtained by biopsy or surgery, whenever possible. 3. Prolong the incubation time.
<input type="checkbox"/> The backgrounds are intensively stained in all the slides.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Endogenous enzyme activity was not completely blocked. 2. Non-specific binding compositions are found. 3. Autolysis results in excessive antigens isolated in histological solutions. 4. Insufficient removal of paraffin. 5. Insufficient washing of antibody. 6. A high room temperature accelerates enzyme reactions. 7. Drying-out of specimens during staining after of the reagents. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Ensure that the procedure for quenching of endogenous peroxidase is right. 2. Before adding primary antibody, treat with 10% normal goat serum. 3. Obtain fresh tissues whenever available. 4. Change xylene or ethanol as the case may be. 5. Ensure thorough washing of antibody. 6. Keep room temperature at 15 to 25°C. 6. Shorten reaction time. 7. Never allow the tissue to dry out.
<input type="checkbox"/> During the reaction, tissue sections come off from the slides.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Some antigens require heat induced antigen retrieval procedure or prolonged reaction time with primary antibody, which may render the sections easily come off. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Mount tissue sections on slides coated with an adhesive such as 0.02% poly-L-lysine or silane.

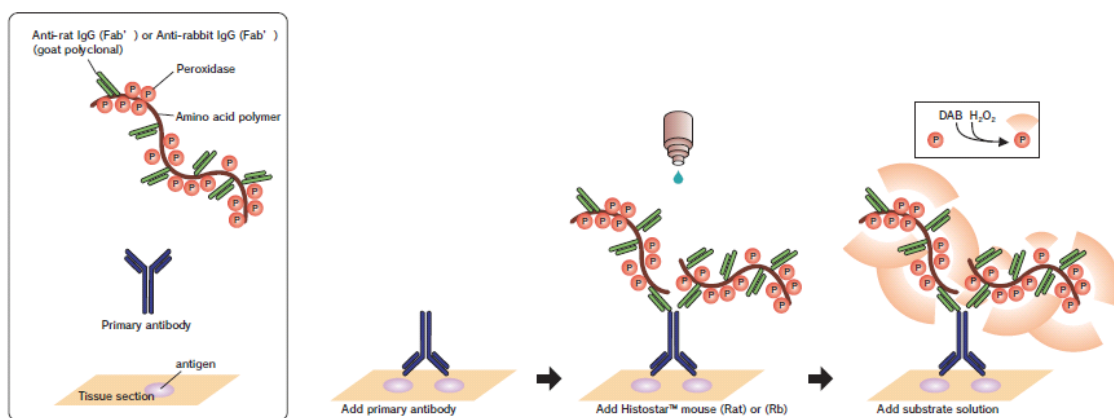
はじめに

免疫組織化学染色法は抗原-抗体反応を利用して、目的とするタンパク質の細胞内および組織内の局在を検出する手法です。特に、直接または間接的に酵素標識した抗体を抗原に対して反応させ、その酵素を化学的に発色させて光学顕微鏡で観察する酵素抗体法は、病理診断や形態学的研究に広く用いられています。Histostar™は、多数の西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP) と Fab' 化した 2 次抗体をアミノ酸ポリマーに結合させた試薬です。従来、酵素抗体法においてはアビジン-ビオチン化ペルオキシダーゼ複合法 (ABC 法) や、ストレプトアビジン-ビオチン化ペルオキシダーゼ複合法 (SAB 法) が多く用いられてきましたが、これらの反応系においては 1 次抗体反応後、ビオチン化 2 次抗体反応、更に酵素標識ストレプトアビジン反応の 3 ステップの反応が必要でした。Histostar™はアミノ酸ポリマーに HRP と 2 次抗体が結合しているため、2 ステップに省略でき、高感度で迅速に免疫組織染色を行うことが可能です。また、アビジン (ストレプトアビジン) -ビオチン系を利用した反応では、内在性のビオチンによる染色への影響が心配されますが、Histostar™はアビジン (ストレプトアビジン) -ビオチン系を利用していないため、内在性のビオチンによる染色への影響を受けません。

原理

Histostar™は、酵素抗体法により組織中の抗原を検出します。組織または細胞切片に、まず目的の抗原に対する 1 次抗体を反応させます。次に 1 次抗体由来の動物種に適合する Histostar™を反応させます。その結果、抗原・抗体・ポリマー・酵素の複合体が形成されます。この複合体の酵素活性を利用して基質を発色させ、抗原部位を染色します。このように視覚化した後、光学顕微鏡観察によって抗原の有無を判定します。

1 次抗体にラット 1 次抗体を使用してマウス組織を染色する場合は Histostar™ mouse (Rat) を、ウサギ 1 次抗体を使用してマウス組織を染色する場合は Histostar™ mouse (Rb) をご利用して下さい。



性状

アミノ酸ポリマーに、ペルオキシダーゼと Fab' 化した 2 次抗体 (ヤギポリクローナル抗体) を結合させた標識ポリマー試薬です。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) で希釈調製済みですので、そのまま使用できます。

Histostar™ mouse (Rat) はアミノ酸ポリマーにペルオキシダーゼと Fab' にした抗ラット IgG を結合させた標識ポリマーです。標識に使用されている 2 次抗体 (Fab') は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後、マウス IgG とマウス血清タンパク質で吸収処理されています。

Histostar™ mouse (Rb) はアミノ酸ポリマーにペルオキシダーゼと Fab'にした抗ウサギ IgG を結合させた標識ポリマーです。標識に使用されている 2 次抗体 (Fab') は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後、ヒト血清タンパク質、マウス IgG、マウス血清タンパク質で吸収処理されています。

使用上または取り扱い上の注意

本品は研究用試薬です。診断の目的に使用しないで下さい。

構成品

製品名	コード	容量
Histostar™ mouse (Rat)	8463	15 mL × 1 本 (150 テスト)
	8464	15 mL × 3 本 (450 テスト)
Histostar™ mouse (Rb)	8470	15 mL × 1 本 (150 テスト)
	8471	15 mL × 3 本 (450 テスト)

保存

2~8°C で保存してください。凍結は避けてください。

有効期限

製品有効期限は試薬容器に記載してあります。

必要な試薬、器具

- ・ キシレン
- ・ 100%エタノール
- ・ 95%エタノール
- ・ リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) (pH7.6 ± 0.2)
- ・ 3%過酸化水素添加 PBS もしくは 0.3%過酸化水素添加メタノール
- ・ DAB 発色基質
- ・ ブロッキング溶液
- ・ 対比染色用ヘマトキシリン溶液
- ・ 精製水
- ・ 湿潤箱
- ・ 封入剤
- ・ 染色バット

試薬の調製

【構成試薬の調製】

- Histostar™ シリーズはそのまま使用できます。

【構成品以外の試薬の調製】

- ブロッキング溶液
例： 20 mM HEPES (pH 7.4), 1% BSA, 135 mM NaCl
- 3%過酸化水素添加 PBS もしくは 0.3%過酸化水素添加メタノール
- ヘマトキシリン溶液 (対比染色用)

例：Mayer のヘマトキシリン溶液

ヘマトキシリン	1 g
ヨウ素酸ナトリウム	0.2 g
アンモニウムミョウバン	50 g
抱水クロラール	50 g
結晶性クエン酸	1 g
蒸留水	1000 mL

ヘマトキシリン粉末を 1000 mL の蒸留水に溶解し、ヨウ素酸ナトリウムとアンモニウムミョウバンを加えます。すべて溶けた後、クエン酸と抱水クロラールを加えて下さい。ヘマトキシリン溶液は 2~3 ヶ月間を目処に調製してください。

- DAB 発色基質
DAB 基質キット (Histostar™ シリーズ用, MBL; Code no. 8469) の使用をお勧めします。

自家調製例： 7.5 mg の DAB を 150 mL の PBS に溶解した後、30% H₂O₂ を 40 μL 加えてください。

*DAB は発癌性の恐れがあるので皮膚への接触は避け、取り扱いには十分注意してください。

サンプルの準備

1-1 パラフィン包埋組織

高濃度の固定液にさらしたり、長時間の固定を行うと、組織崩壊や抗原変性を生じさせる事があります。組織形態や抗原活性を維持した最適な固定状態を得るために、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お勧めします。

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

1-2 スライド切片の作製

切片を 3-6 μm に薄切し、スライドに付着させてください。熱による抗原賦活処理やトリプシンなどの蛋白消化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でコートされたスライドを使用してください。パラフィンが溶けきらない温度 (37°C ~40°C) で十分に伸展させてください (乾燥時間数時間から一昼夜)。

2 凍結組織

不安定な抗原の場合は凍結切片標本を用いてください。組織は液体窒素またはドライアイス-アセトンで冷やした n-ヘキサン中で急速凍結し、包埋には O.C.T コンパウンドまたは類似の包埋剤を用いてください。新しく切り出した切片はあらかじめ 0.02% poly-L-Lysine 水溶液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て、十分に乾燥させた後、100%アセトンで常温 10 分間固定処理を行うか、4%パラホルムアルデヒド/PBS 溶液で 4°C 10 分間固定処理してください。固定後は PBS で洗浄後、直ちに染色してください。直ちに染色しない場合は、-80°C で保存する事もできますが、長期間保存すると染色強度が落ちることがあるので注意してください。赤血球、顆粒球の含有量が多くない場合は内因性ペルオキシダーゼの不活化処理を省略する事ができます。

3 スライドの準備

以下のスライドを準備して下さい。

【検体標本スライド】

- ・ 検定用スライド：目的とする 1 次抗体を使用します。
- ・ 試薬対照用スライド：目的とする 1 次抗体のネガティブコントロール抗体を使用して染色を行ってください。

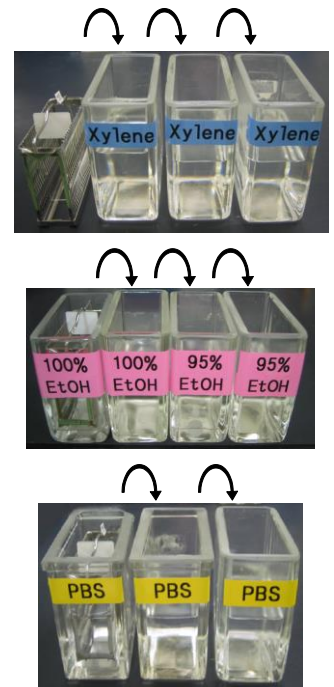
【検体対照スライド】

- ・ 陽性コントロール：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：検体標本スライドと同様の方法で作成され、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。

プロトコール

A. 脱パラフィン（パラフィン包埋切片）

1. キシレン（1~3 槽）に各 3 分間、浸します。
2. 100%エタノール（1~2 槽）に各 3 分間、浸します。
3. 95%エタノール（1~2 槽）に各 3 分間、浸します。
4. PBS（1~3 槽）に各 3 分間、浸します。



B. 抗原の賦活化

必要に応じて抗原性を回復させるための前処理を行ってください。(必要ない場合はCへ進んでください。)加熱処理による抗原賦活化法を行う場合は組織切片用接着剤でコートされたスライドを使用してください。なお以下に紹介する方法は一例であり、目的とする抗原毎に条件検討を実施する必要があります。

【加熱処理による抗原賦活化法】

*賦活化溶液

① 10 mM クエン酸緩衝液 (pH 6.0)

〈調製法〉クエン酸三ナトリウム二水和物 ($C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$) 2.94 g を 900 mL の蒸留水に溶解し、0.1 M クエン酸一水和物 ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) で pH 6.0 に調整後、蒸留水で全量を 1000 mL にしてください。

② 1 mM EDTA 溶液 (pH 8.0)

〈調製法〉0.5 M EDTA 溶液 (pH 8.0) 2 mL に蒸留水 998 mL を加えて 1000 mL にします。

*操作方法

・電子レンジ (Micro Wave) 処理

1. 染色かごに入れたスライドを 500 mL のビーカーに入れ、切片がしっかり隠れるまで溶液を満たします。金属製の染色かごを使用する場合は、染色かごが溶液に完全に浸かった状態にしてください。完全に密封してしまわないようにサランラップ等を被せます。
2. 500 W で 10 分間加熱します。一度電子レンジより取り出し、溶液が減少している場合は、沸騰させておいた溶液を加えます。
3. 再度 500W で 10 分間加熱します。
4. 室温に放置しゆっくりと冷まします。(40 分間以上)

・オートクレーブ処理

1. 500 mL のビーカーに染色かごに入れたスライドをいれ、切片がしっかり隠れるまで溶液を満たします。
2. 120°C で 5 分間処理します。

3. 圧力が十分下がった後、ビーカーごと取り出します。
4. 室温に放置しゆっくりと冷まします。(40 分間以上)

【蛋白分解酵素を用いた抗原賦活化法】

* 蛋白分解酵素溶液

① 0.1% トリプシン溶液

〈調製法〉 100 mL の 50 mM Tris buffer (pH 7.6) に trypsin 100 mg、塩化カルシウム 100 mg を加えて調製します。

② 0.4% ペプシン溶液

〈調製法〉 100 mL の 0.01 N 塩酸に pepsin 400 mg を加えて調製します。

* 操作方法

- ・ 蛋白分解酵素溶液に標本スライドを浸し、37°C で 30 分間処理します。

C. 染色手順

【内因性ペルオキシダーゼの除去*】

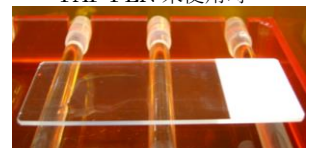
1. スライドを PBS 中から 3%過酸化水素添加 PBS (10 分間) もしくは 0.3%過酸化水素添加メタノール (30 分間) に浸し、室温にて処理します。切片が完全に溶液に浸っているか注意してください。
2. PBS にて 5 分間、2 回洗浄します。

*凍結切片の場合、本ステップは 1 次抗体反応後に行ってください。

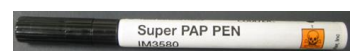
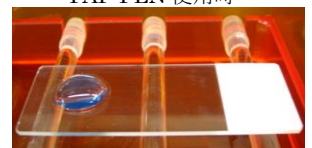
【1 次抗体非特異反応のブロッキング】

3. スライドを PBS 中より取り出し、切片のまわりを注意深く拭きます。
4. PAP-PEN (Thermo Fisher; Code no. 008899) で切片の周りを囲みます。(PAP-PEN で切片の周りを囲むことで反応溶液が拡散しないようにします。)
5. ブロッキング溶液を切片に滴下し、10~15 分間室温にて処理します。

PAP-PEN 未使用時



PAP-PEN 使用時



【1次抗体反応】

6. Step 5.のブロッキング溶液を軽く振り落とし、切片が完全に被われるように1次抗体を滴下します。室温にて1時間、もしくは4°Cで一晩反応させます。(反応条件はご使用の抗体にあわせて検討してください)
7. PBS で5分間、3回洗浄します。

【Histostar™の添加・反応】

8. 切片の周りを注意深く拭き、Histostar™を滴下して30分間室温にて反応させます。
9. PBS で5分間、3回洗浄します。

【基質溶液の添加・反応】

10. 切片の周りを注意深く拭きます。
11. 切片が完全に被われるように基質溶液を滴下し、反応させます。発色の様子を見ながら反応時間を決めてください(5分~20分間)。
12. 精製水でよくすすぎます。

【対比染色】

13. ヘマトキシリン溶液に1分間浸し、対比染色を行います。5分間以上浸さないと染色されない場合はヘマトキシリン溶液を新しくして下さい。
14. 流水で洗浄します。

【封入】

15. PBS (1~3槽) に各5分間浸します。
16. エタノール (1~3槽) に各3分間浸し、脱水します。
17. キシレンに各5分間、3回浸し、透徹します。
18. 封入剤で封入します。

染色結果の判定方法

【判定方法】

光学顕微鏡によって陽性反応を観察します。

染色結果の判定は下記3種類の対照スライドと比較して行ってください。

- ① 陽性コントロールスライド
- ② 陰性コントロールスライド
- ③ 試薬対照スライド（このスライドが染色されていると非特異的なタンパク結合などによる非特異反応が考えられます。）

【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、染色結果を判定してください。
- 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す。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ります。
- 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ります。偽陽性結果は赤血球による偽ペルオキシダーゼ反応によっても起きることがあります。
- 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、十分注意して判定してください。
- 5) 間質系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、十分注意して判定してください。
- 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ります。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、十分注意して判定してください。

使用上、取り扱い上の注意

【取り扱い上の注意】

- 1) ヒト由来の検体は感染の危険性があるため、取り扱いには十分に注意してください。
- 2) 検体組織にはHIV、HBVなど、感染の恐れがあるので取り扱いには十分に注意してください。

【使用上の注意】

- 1) 試薬は2-8°Cで保存し、有効期間の過ぎた試薬は使用しないでください。
- 2) 試薬は使用前に室温に戻してから使用してください。
- 3) 試薬が皮膚などに直接付かないように注意してください。

【染色に関する注意】

- 1) パラフィンが切片に残っているとバックグラウンドを強める原因になりますので、脱パラフィンは確実に行ってください。
- 2) 染色中に切片を乾燥させないように注意してください。
- 3) 抗原の中には熱に不安定なものもありますので、組織を包埋する際、パラフィン温度が58°C以上にならないように注意してください。
- 4) 脱パラフィンに用いるキシレン及びエタノールは、新鮮なものを用いてください。
- 5) ステロイドやその他の小さな分子は、有機溶媒に非常に溶けやすいため、抗原の消失を防ぐために、固定剤の選択に注意してください。

廃棄上の注意

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121°C、20分間滅菌処理するか、または1.0%（v/v）次亜塩素酸などの消毒液に浸して一晚処理してください。

トラブルシューティング

問題点	考えられる原因	対策
染色が認められない、あるいは弱い	<ul style="list-style-type: none"> ① 切片が乾燥している ② 包埋剤が不適當、あるいはパラフィン包埋組織からの脱パラフィンが不十分 ③ 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失活させている ④ 酵素や抗体反応が不十分 ⑤ 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 ⑥ 組織に存在する抗原が少ない ⑦ 自己消化により抗原が破壊されている 	<ul style="list-style-type: none"> ① 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 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 ③ アジ化ナトリウムを含有しない緩衝液を使用する ④ 古い基質溶液を取り替える。 ④ 各ステップでの水分の拭き取りを完全にする ④ 抗体反応時間を十分にする ⑤ 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 ⑤ 抗原賦活化処理やトリプシンなどのタンパク分解酵素処理を行う ⑥ インキュベーション時間を長くする ⑦ 採取した組織はすみやかに適切な方法で固定を行う
バックグラウンドが強い	<ul style="list-style-type: none"> ① 内因性ペルオキシダーゼ処理が不十分 ② 非特異結合成分がある ③ パラフィン除去が不十分 ④ 1次抗体反応後の洗浄が不十分 ⑤ 室温が高すぎて酵素反応が早すぎる 	<ul style="list-style-type: none"> ① 3%過酸化水素添加メタノールによるクエンチング処理を確実にを行う ② 10%ヤギ正常血清などでのブロッキングを確実にを行う ③ キシレン、エタノールを新しくする ④ 抗体の洗浄回数を増やす ⑤ 15-25°C で反応させる ⑤ 反応時間を短縮する
組織切片がスライドから剥がれてしまう	<ul style="list-style-type: none"> ① スライドが組織切片用接着剤でコートされていない 	<ul style="list-style-type: none"> ① シランやMAS コートされたスライドを使用する