



研究用試薬

ヒストファイブ

第一抗体

CD34 モノクローナル抗体 (NU-4A1)

(動物種 : マウス)

包装 : 50 テスト (6mL)

Code : 413111

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

■ 特異性および抗原分布 : ヒト造血幹細胞抗原と特異的に反応する。骨髄単核細胞の1-3%と反応する。

この画分には造血幹細胞と造血前駆細胞が含まれる。また、急性骨髄性白血病細胞および急性リンパ性白血病細胞の一部と反応する。血管内皮細胞および平滑筋や神経に付随する線維芽細胞の一部あるいは乳腺における小葉のストローマ細胞などに反応することが認められている。

■ 国際抗体分類 : Fifth International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens (1993)でCD34に分類されている。

■ クローン名 : NU-4A1

■ 抗体のサブクラス : IgG1

■ 由来 : 培養上清液より、プロテインAアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製している。

1. 内容

第一抗体・・・CD34モノクローナル抗体(NU-4A1)(動物種 : マウス)。

液状。

ウシ血清アルブミン(BSA)と、0.1%アジ化ナトリウムを含むリン酸緩衝生理食塩水(PBS)にて、即時使用可能な抗体濃度に希釈済み。

1バイアル中に6mLを含む。

2. 使用目的

組織・細胞中のヒトCD34抗原の染色。血管内皮細胞の同定に有用である。

**3. 使用方法

パラフィン包埋切片の免疫組織化学染色および免疫細胞化学染色に使用できる第一抗体である。

パラフィン包埋切片の場合、前処理(抗原賦活化)として10mMクエン酸緩衝液(pH6.0)を用いたマイクロウェーブ処理またはオートクレーブ処理が必要である(裏面の操作手順参照)。

スライド上の組織切片が完全に覆われるように第一抗体を2滴(100μL)滴下し、常温(15-25℃)で30分~1時間インキュベートする。**

この反応時間は、ヒストファイブ シンプルステイン MAX-PO(M)を使用する場合の目安であり、他のキットを使用する場合は、研究者自身が至適反応時間を調べる必要がある。

■ 参考 : 組織の固定状況等により抗原賦活化処理なしで良好な染色結果が得られる場合がある。ただし、この場合は検体に対して4℃で1晩インキュベートすること。

4. 貯法

2-8℃保存。

5. 使用上又は取扱上の注意

ヒト由来の検体は、取扱者に感染をひき起こす危険性がある。従って、適切な取扱および廃棄法を用いるとともに、この免疫組織(細胞)化学染色法を施行するに際し、関連技術および操作法に充分習熟しておかなければならない。

6. 主要文献

1) Parravicini, C. et al. : Leucocyte Typing V . 854, 1995

■ 研究用としてのみ使用すること。

免疫染色における操作手順**

■ 操作手順

[切片の準備]

1. 50℃で十分に湯伸ばしした切片(3-4 μ m 厚)をシランなどのコーティングスライド上に貼り付け、37℃の恒温器内で16時間以上乾燥させる。
2. 脱パラフィン → 親水化 → PBS
3. 前処理(抗原賦活化)：マイクロウェーブ(MW)処理またはオートクレーブ処理
 - ・マイクロウェーブ処理の場合
 - ① 緩衝液(下記記載)をバットに入れ、MW 照射し沸騰させる。
 - ② 沸騰した緩衝液に切片を浸し、MW を5分間照射する。
 - ③ MW 照射による沸騰で緩衝液は蒸発する。蒸発により緩衝液が減少し、切片の乾燥が危惧される場合は、ビーカー等であらかじめ沸騰させておいた精製水を減少した分だけ加える。
 - ④ ②のMW 照射をもう1-2回繰り返す。
※MW 照射を1回(照射時間10-15分間程度)のみで行っても良い。
 - ⑤ バットごと切片を常温(15-25℃)に20分間以上放置し、ゆっくり熱を冷ます。
※MW 処理後は、バットおよび緩衝液等が高温になっている。これらを取り扱う際は、手袋等を使用し火傷に注意する。
 - ⑥ スライドを緩衝液から取り出し、PBS 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)。
 - ・オートクレーブ処理の場合
 - ① 緩衝液(下記記載)を耐熱性バットに入れ、切片を浸す。
 - ② バットに蓋をする。蓋が取れないように輪ゴムでとめる。
 - ③ 120℃、20分間オートクレーブ処理する。
 - ④ 圧力が十分下がった後、バットごと切片を取り出す。
 - ⑤ バットの蓋をはずし、バットごと切片を常温に20分間以上放置し、ゆっくり熱を冷ます。
※オートクレーブ処理後は、バットおよび緩衝液等が高温になっている。これらを取り扱う際は、手袋等を使用し火傷に注意する。
 - ⑥ スライドを緩衝液から取り出し、PBS 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)。

[染色手順] < シンプルステイン MAX-PO(M)使用の場合 >

4. 内因性ペルオキシダーゼの除去 10-15分間/常温 → PBS 洗浄
5. 第一抗体の添加・反応 30分~1時間/常温 → PBS 洗浄**
6. シンプルステイン MAX-PO(M)の添加・反応 30分間/常温 → PBS 洗浄
7. 基質溶液の添加・反応 DAB 発色 → 水洗
8. 対比染色 核染(ヘマトキシリン) → 封入 → 乾燥 → 検鏡

■ 注意

- ・ 「PBS 洗浄」は PBS に浸し、5分間ずつ3回放置する。
 - ・ 4.のプロセスは3.の前に行ってもよい。
 - ・ ヒストファイン SAB キットを使用する場合は上記1.~4.までを行い SAB キットの操作方法に従って染色を行う。
-
- ・ 10mM クエン酸緩衝液(pH6.0)の作り方
A液 9mL+B液 41mL+精製水 450mL(用時調製)

A液：0.1M クエン酸水溶液 クエン酸一水和物(C ₆ H ₈ O ₇ · H ₂ O)2.1g/精製水 100mL
B液：0.1M クエン酸ナトリウム水溶液 クエン酸三ナトリウム二水和物(C ₆ H ₅ O ₇ Na ₃ · 2H ₂ O)14.7g/精製水 500mL

A液、B液は常温で保存可能である。ここから必要な時に調製する。