



研究用試薬

## ヒストファイン

第一抗体

### CD8モノクローナル抗体

(動物種：マウス)

包装：50テスト(6mL)

Code：413201

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 CD8 抗原と同等の分子量 32kDa の蛋白質と特異的に反応し、cytotoxic/suppressor T 細胞を染色する。

■ クローン名：C8/144B

■ 抗体のサブクラス：IgG1、 $\kappa$

■ 製法：①免疫原・・・CD8 抗原の細胞内領域の C 末端にある 13 個のアミノ酸配列

(Lys-Ser-Gly-Asp-Lys-Pro-Ser-Leu-Ser-Ala-Arg-Tyr-Val)の Lys に Cys を結合したペプチドをサイログロブリン結合させたものである。

②免疫法・・・免疫原で免疫した Balb/c マウスの脾細胞を用いて得た融合細胞(ハイブリドーマ)から抗体産生細胞を得ている。

■ 由来：ハイブリドーマの培養上清より得ている。

#### 1. 内容

第一抗体・・・CD8 モノクローナル抗体(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 CD8 陽性ヒト T 細胞の染色。

#### \*\*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(100  $\mu$  L)滴下し、常温(15-25°C)で 30 分~1 時間インキュベートする。 \*\*

この反応時間は、ヒストファイン 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：10mM クエン酸緩衝液(pH6.0)の代わりにヒストファイン 抗原賦活化液 pH9(Code：415201 または Code：415211)を用いたオートクレーブ処理をすることで良好な染色が得られる場合がある(裏面の■参考参照)。

#### 4. 貯法

2-8°C 保存。

#### 5. 使用上又は取扱上の注意

ヒト由来の検体は、取扱者に感染を引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) Mason, D. Y. et al : J. Clin. Pathol. 45 : 1084, 1992

■ 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°Cで十分に湯伸ばしした切片(3-4 $\mu$ 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°C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)：オートクレーブ処理
  - 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。
  - ③120°C、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] <ヒストファイン 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：常温で保存可能

クエン酸一水和物 (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> · H<sub>2</sub>O) 2.1g/精製水 100mL

B液：0.1M クエン酸ナトリウム水溶液：常温で保存可能

クエン酸三ナトリウム二水和物 (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Na<sub>3</sub> · 2H<sub>2</sub>O) 14.7g/精製水 500mL

ここから必要な時に調製する。

## ■ 参考：ヒストファイン 抗原賦活化液pH9(Code：415201またはCode：415211)、オートクレーブ処理を用いる場合(おもて面の■参考参照)

### ・抗原賦活化液pH9の作り方

・ Code：415201 抗原賦活化液pH9 (調製済)は、そのまま用いる。

・ Code：415211 抗原賦活化液pH9 (10倍濃縮)は、精製水で10倍希釈する。