



研究用試薬

ヒストファイイン

第一抗体

CD3 モノクローナル抗体 (PS1)

(動物種: マウス)

包装: 50 テスト(6mL)

Code: 413241

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 CD3 の ϵ 鎖と特異的に反応する。T 細胞の細胞膜と一部細胞質に反応し、T 細胞マーカーとして用いられる。CD3 は 5 種類の鎖(γ 、 δ 、 ϵ 、 ζ 、 η)があり、T 細胞抗原受容体(T CELL receptor)に結合している。

■**クローン名**: PS1

■**抗体のサブクラス**: IgG2a

■**免疫原**: リコンビナントヒト CD3 ϵ 鎖の細胞外ドメイン。

■**製法**: 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・・・CD3 モノクローナル抗体(PS1)(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 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)としてヒストファイイン 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 μ L)滴下し、常温(15-25 $^{\circ}$ 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**: ヒストファイイン 抗原賦活化液 pH9(Code: 415201 または Code: 415211)の代わりに 10mM クエン酸緩衝液(pH6.0)を用いたマイクロウェ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)。ただし、この場合は検体に対して 4 $^{\circ}$ C で 1 晩インキュベートすること。

4. 貯法

2-8 $^{\circ}$ 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) Steward, M., et al: Histopathology 30: 16-22, 1997

■**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(3-4µm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.までを行いSABキットの操作方法に従って染色を行う。
- ・ 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。

■ 参考 : 10mMクエン酸緩衝液(pH6.0)、マイクロウェーブ処理を用いる場合(おもて面の■参考参照)

前処理(抗原賦活化): マイクロウェーブ(MW)処理

- ① 10mMクエン酸緩衝液(pH6.0)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。
- ⑤ 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。
※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。
※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。
- ⑥スライドを10mMクエン酸緩衝液(pH6.0)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)。

・ 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 (C₆H₈O₇ · H₂O) 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 (C₆H₅O₇Na₃ · 2H₂O) 14.7g/精製水 500mL
- ここから必要な時に調製する。