



研究用試薬

ヒストファイン

第一抗体
抗 MART-1/Melan-A モノクローナル抗体
(動物種: マウス)

包装: 50 テスト (6mL)

Code: 413381

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 MART-1/MelanA 抗原と特異的に反応する。MART-1/Melan-A 抗原は細胞障害性 T 細胞により認識される分子量 18-22kDa のメラノサイト特異的な膜貫通型タンパクである。正常では、皮膚のメラノサイト、網膜や母斑細胞、腫瘍では悪性黒色腫(約 80%)や血管筋脂肪腫に発現が見られる。近年、悪性黒色腫の免疫療法の標的候補としても注目されている。

■ **クローン名**: M2-7C10

■ **抗体のサブクラス**: IgG2b

■ **製法**: ①免疫原・・・大腸菌で作製したリコンビナントヒト MART-1/Melan-A タンパク
②免疫法・・・免疫原で免疫した Balb/c マウスの脾細胞とマウスミエローマ細胞 SP/0-Ag14 との融合細胞(ハイブリドーマ)から抗体産生クローンを得ている。

■ **由来**: マウスの腹水より得ている。

1. 内容

第一抗体・・・抗 MART-1/Melan-A 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)中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 MART-1/Melan-A 抗原の染色。

**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 μ 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**: 組織の固定状況等によりオートクレーブ処理の代わりにマイクロウェーブ処理をすることで、より良好な染色結果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) Kawakami Y., et al : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 : 3515-3519, 1994
- (2) Kawakami Y., et al : The Journal of Experimental Medicine 180 : 347-352, 1994
- (3) Licia R., et al : The Journal of Immunology 154 : 2257-2265, 1995
- (4) Francesco M., et al : Journal of Immunotherapy 19 : 192-205, 1996
- (5) Kawakami Y., et al : Journal of Immunological Methods 202 : 13-25, 1997
- (6) Michael W. B., et al : CANCER(CANCER CYTOPATHOLOGY) 81 : 57-63, 1997
- (7) Patricia A. Fetsch., et al : Journal of Immunotherapy 20 : 60-64, 1997
- (8) Patricia A. Fetsch., et al : Modern Pathology 11 : 699-703, 1998
- (9) Patricia A. Fetsch., et al : CANCER(CANCER CYTOPATHOLOGY) 87 : 37-42, 1999
- (10) Lawrence L. Yu., et al : CANCER 86 : 617-627, 1999

■ 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および前処理(抗原賦活化)**

■ 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 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°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。
 - ③ 120°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、または洗浄ピンを使用する)。

[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 (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。

* ■ 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 緩衝液を耐熱性バットに入れ、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 再度、MWを5分間照射する。必要であれば、さらにもう一回、MWを5分間照射する。
- ※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てからMW照射を行うこと。
- ※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。
- ④ バットごと切片を常温(15-25°C)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。
- ⑤ スライドを緩衝液から取り出し、PBSにて洗浄する。