



研究用試薬

ヒストファイン

第一抗体

抗ヒト *c-kit* 遺伝子産物ポリクローナル抗体

(動物種: ウサギ)

包装: 50テスト (6mL)

Code: 413391

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

■ **特異性及び抗原分布:** ヒト *c-kit* 遺伝子産物(分子量 145kDa)と特異的に反応する。*c-kit* 遺伝子産物は SCF(Stem cell Factor)のレセプターであり、結合することにより未分化造血前駆細胞の増殖と分化、肥満細胞の増殖誘導、メラノサイトや生殖細胞の移動や分化が認められる。*c-kit* 遺伝子産物は、肥満細胞や Cajal の介在細胞(Interstitial cells of Cajal; ICCs)由来と考えられている消化管の GIST (Gastrointestinal stromal tumor)、精上皮腫/未分化胚細胞腫や肥満細胞由来腫瘍の大部分及び悪性黒色腫や肺癌の一部などで発現がみられる。正常では、肥満細胞や精細管、乳管上皮、胃の壁細胞、神経膠細胞、メラノサイトの一部に発現がみられる。

■ **製法:** ①免疫原・・・ヒト *c-kit* 遺伝子産物の C 末端ペプチド。
②免疫法・・・免疫原をウサギに免疫して抗血清を得ている。

■ **精製法:** ウサギ抗血清より、上記ペプチドでアフィニティー精製している。

1. 内容

第一抗体・・・抗ヒト *c-kit* 遺伝子産物ポリクローナル抗体(動物種: ウサギ)。

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 *c-kit* 遺伝子産物の染色。GIST の判別に有用。

ホルマリン固定パラフィン包埋切片の免疫染色に使用できる。

研究用としてのみ使用すること。

**3. 使用方法

組織切片の場合、前処理(抗原賦活化)としてヒストファイン 抗原賦活化液 pH9 (Code:415201 又は Code:415211)を用いた温浴処理が必要である(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、ヒストファイン シンプルステイン MAX-PO(R)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:** 組織の固定条件等により前処理(抗原賦活化)としてヒストファイン 抗原賦活化液 pH9(Code:415201 又は Code:415211)を用いたオートクレーブ処理で良好な染色結果が得られる場合がある。(裏面の■**参考**参照)。

■ 組織の固定状況等が染色結果に影響を及ぼすため学会等が推奨する固定液や固定時間を遵守し、検体の取扱いには十分注意すること。染色条件を変更することで良好な染色結果が得られる場合があるが、組織へのダメージや偽陽性化、偽陰性化が起こるおそれがあるため、研究者自身の責任において至適条件をよく検討すること。

**4. 貯法及び使用上の注意

- 2-8 $^{\circ}$ C 保存。
- 使用期限はラベルに記載されているので使用前に確認すること。
- 使用前に室温に戻すこと。
- 使用後は速やかに冷蔵保存すること。
- 異なるロットの試薬や他製品の試薬を混ぜたりしないこと。

**5. 取扱い上(危険防止)の注意

- 使用期限の過ぎた試薬は使用しないこと。
- 本品に関する化学物質の安全情報は安全データシート(SDS)を参照すること。
- 本品を吸い込んだり、眼、口、皮膚、衣類などへの接触を避けること。
- 本品の廃棄の際には、各施設や地域及び国のルールに従い、適切に廃棄すること。
- 本品は、動物由来成分を含むので、取扱いに注意が必要である。
- 本品にはアジ化ナトリウムが含まれている。アジ化ナトリウムは水道管に含まれる銅、鉛との反応によって爆発の危険性があるので、多量の水とともに洗い流すこと。
- ヒト由来の検体は、感染の恐れがあるので適切な取扱い及び廃棄法を用いるとともに、免疫染色を実施するにあたって、関連技術及び操作法に充分習熟しておかなければならない。

6. 参考文献

- (1) Matsuda R, et al. Expression of the c-kit protein in human solid tumors and in corresponding fetal and adult normal tissues. Am J Pathol. 1993 Jan;142(1):339-46.
- (2) Tsuura Y, et al. Preferential localization of c-kit product in tissue mast cells, basal cells of skin, epithelial cells of breast, small cell lung carcinoma and seminoma/dysgerminoma in human: immunohistochemical study on formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. Virchows Arch. 1994;424(2):135-41.
- (3) Yamataka A, et al. A lack of intestinal pacemaker (c-kit) in aganglionic bowel of patients with Hirschsprung's disease. J Pediatr Surg. 1995 Mar;30(3):441-4.
- (4) Yamataka A, et al. Lack of intestinal pacemaker (C-KIT-positive) cells in infantile hypertrophic pyloric stenosis. J Pediatr Surg. 1996 Jan;31(1):96-8; discussion 98-9.
- (5) Yamataka A, et al. Localization of intestinal pacemaker cells and synapses in the muscle layers of a patient with colonic hypoganglionosis. J Pediatr Surg. 1996 Apr;31(4):584-7.
- (6) Yamataka A, et al. Intestinal pacemaker C-KIT+ cells and synapses in allied Hirschsprung's disorders. J Pediatr Surg. 1997 Jul;32(7):1069-74.
- (7) Arber DA, et al. Weiss LM. Paraffin section detection of the c-kit gene product (CD117) in human tissues: value in the diagnosis of mast cell disorders. Hum Pathol. 1998 May;29(5):498-504.
- (8) Kindblom LG, et al. Gastrointestinal pacemaker cell tumor (GIPACT): gastrointestinal stromal tumors show phenotypic characteristics of the interstitial cells of Cajal. Am J Pathol. 1998 May;152(5):1259-69.
- (9) Yamataka A, et al. Abnormal distribution of intestinal pacemaker (C-KIT-positive) cells in an infant with chronic idiopathic intestinal pseudoobstruction. J Pediatr Surg. 1998 Jun;33(6):859-62.
- (10) Hirota S, et al. Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. Science. 1998 Jan 23;279(5350):577-80.
- (11) Ernst SI, et al. KIT mutation portends poor prognosis in gastrointestinal stromal/smooth muscle tumors. Lab Invest. 1998 Dec;78(12):1633-6.
- (12) Komuro T, et al. Ultrastructural characterization of the interstitial cells of Cajal. Arch Histol Cytol. 1999 Oct;62(4):295-316.
- (13) 秋濱 玄 他. Gastrointestinal stromal tumor の組織発生及び悪性度の解析. 岩手医誌. 1999;51:381-390.
- (14) Natkunam Y, Rouse RV. Utility of paraffin section immunohistochemistry for C-KIT (CD117) in the differential diagnosis of systemic mast cell disease involving the bone marrow. Am J Surg Pathol. 2000 Jan;24(1):81-91.
- (15) Maeyama H, et al. Familial gastrointestinal stromal tumor with hyperpigmentation: association with a germline mutation of the c-kit gene. Gastroenterology. 2001 Jan;120(1):210-5.

免疫染色における操作手順及び前処理(抗原賦活化)

■ 操作手順

[切片の準備]

1. 50℃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℃の恒温器内で16時間以上乾燥させる。

[脱パラフィン]

2. 脱パラフィン → 親水化 → PBS

[抗原賦活化処理]

3. 前処理(抗原賦活化): 温浴処理

- ①温浴槽をあらかじめ95-99℃に温めておく。以下の操作を行うにあたり、手袋等を用いて高温による火傷に注意する。
- ②調製した抗原賦活化液(下記参照)を耐熱性の染色バットに入れ、ゆるく蓋をする。これを温浴槽に入れ、95-99℃に温める。
- ③抗原賦活化液の温度が95-99℃に達したら、スライドを抗原賦活化液に浸漬させ、ゆるく蓋をする。
- ④抗原賦活化液の温度が再び95-99℃まで上昇したことを温度計で確認してから、40分間、95-99℃でインキュベートする。
- ⑤染色バットを温浴槽から取り出し、蓋をはずす。スライドを浸したまま常温(15-25℃)で20分間放置しゆっくり熱を冷ます。
- ⑥スライドを抗原賦活化液から取り出し、PBSで洗浄する(洗浄用容器を2度かえ3分間の洗浄操作を3回繰り返すか、又は洗浄びんを使用する)。

[染色手順] <ヒストファイน์ シンプルステイン MAX-PO(R)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(R)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5分間ずつ容器を2度かえるか、又は洗浄びんを使用する。
- ・4.のプロセスは3.の前に行ってもよい。
- ・ヒストファイน์ 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。
- ・抗原賦活化液

「抗原賦活化液 pH9」の調製方法

- | |
|---|
| ・ 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: ヒストファイน์ 抗原賦活化液pH9 (Code:415201又はCode:415211)を用いたオートクレーブ処理を用いる場合

前処理(抗原賦活化): オートクレーブ処理

- ①調製した抗原賦活化液(上記記載)を耐熱性の染色バットに入れ、スライドを浸漬させる。
 - ②染色バットに蓋をする。蓋が取れないように輪ゴムでとめる。
 - ③120℃、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、染色バットをオートクレーブから取り出し、蓋をはずす。スライドを浸したまま常温(15-25℃)で20分間放置しゆっくり熱を冷ます。
- ※オートクレーブ処理後は、染色バット及び抗原賦活化液等が高温になっている。これらを取り扱う際は、手袋等を使用して火傷に注意する。
- ⑤スライドを抗原賦活化液から取り出し、PBSで洗浄する(洗浄用容器を2度かえ3分間の洗浄操作を3回繰り返すか、又は洗浄びんを使用する)。