



研究用試薬

ヒストファイイン

第一抗体

D2-40 モノクローナル抗体

(動物種 : マウス)

包装 : 50 テスト (6mL)

Code : 413451

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** : O型シアロ糖タンパク質と特異的に反応する。O型シアロ糖タンパク質はヒトリンパ管内皮、胎児精巣、精巣生殖細胞由来の腫瘍中に存在する分子量40kDaの糖タンパク質である。正常組織ではリンパ管内皮に強い染色がみられるが、血管内皮にはみられない。腫瘍では精巣性胚細胞腫瘍¹⁾、リンパ管腫²⁾、カポジ肉腫^{3,8,9,12)}、神経鞘腫⁸⁾、平滑筋肉腫⁸⁾、血管肉腫の一部⁹⁾、悪性中皮腫¹⁵⁾などに染色がみられる。リンパ管浸潤や増殖などが関与している腫瘍組織中のリンパ管の同定に役立つ^{2,10,11)}。

■ **クローン名** : D2-40

■ **抗体のサブクラス** : IgG1

■ **免疫原** : ヒト未分化胚細胞腫組織

■ **由来** : ハイブリドーマの培養上清から得ている。

1. 内容

第一抗体・・・抗ヒトリンパ管内皮抗原モノクローナル抗体 D2-40 (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・細胞中のリンパ管内皮抗原の染色。

**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)を用いたマイクロウェ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** : 組織の固定状況等によりマイクロウェーブ処理の代わりにオートクレ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 $^{\circ}$ 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) Marks A., et al : British Journal of Cancer 80 : 569-578, 1999

(2) Kahn HJ., et al : Laboratory Investigation 82 : 1255-1257, 2002

(3) Kahn HJ., et al : Modern Pathology 15 : 434-440, 2002

(4) Fogt F., et al : International Journal of Molecular Medicine 13 : 211-214, 2004

(5) Fogt F., et al : International Journal of Molecular Medicine 13 : 681-683, 2004

(6) Franke FE., et al : J Cutan Pathol 31 : 362-367, 2004

(7) Bar-Shira Maymon B., et al : Fertility and Sterility 81 : 1391-1394, 2004

(8) Bellucci KSW., et al : USCAP* 2004 Annual Meeting Abstracts [27] : 2004

- (9) Fukunaga M. : USCAP* 2004 Annual Meeting Abstracts [42] : 2004
 (10) Kahn HJ., et al : USCAP* 2004 Annual Meeting Abstracts [136] : 2004
 (11) Giorgadze T., et al : USCAP* 2004 Annual Meeting Abstracts [380] : 2004
 (12) Pantanowitz L., et al : USCAP* 2004 Annual Meeting Abstracts [400] : 2004
 (13) Mitsuhashi T., et al : USCAP* 2004 Annual Meeting Abstracts [517] : 2004
 (14) Acs G., et al : USCAP* 2004 Annual Meeting Abstracts [790] : 2004
 (15) Chu AY., et al : USCAP* 2004 Annual Meeting Abstracts [1412] : 2004
 (16) Choi WWL., et al : USCAP* 2004 Annual Meeting Abstracts [1490] : 2004

* United States and Canadian Academy of Pathology

■ 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]

- 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。
- 脱パラフィン → 親水化 → PBS
- 前処理(抗原賦活化) : マイクロウェーブ(MW)処理
 - ①緩衝液(下記記載)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。

[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)

<p>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。</p>
--

■ 参考 : 10mM クエン酸緩衝液(pH6.0)、オートクレ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) : オートクレーブ処理

- ①緩衝液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)。