



研究用試薬

ヒストファイン

第一抗体

抗サイクリンD1ウサギモノクローナル抗体(SP4)

(動物種:ウサギ)

包装: 50テスト(6mL)

Code: 413521

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: ヒトサイクリンD1(PRAD-1又は*bcl1*)に反応する。サイクリンD1はサイクリンD2、D3を含めた細胞周期制御タンパクの1つで、11番染色体長腕13領域上にある癌遺伝子PRAD1(CCND1)にコードされている36kDaの核内タンパクである。D型サイクリンは、サイクリン依存性キナーゼ(Cyclin-Dependent kinases) Cdk4とCdk6と複合体を形成し、Rbタンパクをリン酸化することにより細胞周期をG1期からS期へ移行させる。マンツル細胞リンパ腫、乳癌を含むヒトの悪性腫瘍において、サイクリンD1の過剰発現がみられる。

■クローン名: SP4

■抗体のサブクラス: ウサギ IgG

■免疫原: ヒトサイクリンD1のC末端の合成ペプチド

■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・・・抗サイクリンD1ウサギモノクローナル抗体(SP4)(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)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・細胞中のヒトサイクリンD1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(100μL)滴下し、常温(15-25℃)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: 組織の固定状況等により10mMクエン酸緩衝液(pH6.0)を用いたオートクレーブ処理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、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℃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) Cheuk, W. et al: Am J Surg Pathol June 2004 Vol. 28(6):801-7

■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] <ヒストファイブ 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。
- ・ ヒストファイブ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 ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) 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 ($C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$) 14.7g/精製水 500mL

ここから必要な時に調製する。

■ 参考: ヒストファイブ 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。