



研究用試薬

ヒストファイン

第一抗体

抗高分子サイトケラチンモノクローナル抗体(34βE12)

(動物種: マウス)

包装: 50テスト(6mL) Code: 413721

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:** ヒト組織中のヒトケラチン1(68kDa)、5(58kDa)、10(56.5kDa)、14(50kDa)と特異的に反応する。ケラチンは分子量(MW)、等電点(pI)により分類される。正常では、扁平上皮、導管腺上皮に反応がみられる。腫瘍では、種類によって反応が異なる。皮膚、乳房、舌、子宮頸部等の扁平上皮癌、乳房や膵臓の腺管癌、皮膚の基底細胞癌、膀胱、尿管、腎臓の移行上皮癌に強く反応がみられる。卵巣嚢胞腺癌、精巣、肺、大腸の腺癌に中程度の強度で反応がみられ、胆嚢や子宮内膜の腺癌、腎細胞癌に弱い反応がみられる。肝細胞癌、小細胞癌、膵島細胞腫、巨細胞腫、平滑筋腫、神経鞘腫、紡錘細胞癌、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫等、単層上皮由来の腫瘍には反応がみられない。前立腺腫瘍の良性、悪性の区別に役立つ。正常前立腺及び良性腫瘍では、基底細胞が陽性となる。悪性腫瘍の場合は、陰性となる。ただし、良性病変でも基底細胞の不連続性が認められることがあるので注意が必要である。

■**クローン名:** 34βE12■**抗体のクラス/サブクラス:** IgG1κ■**免疫原:** ヒト角質層から抽出した可溶性ケラチン■**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・・・抗高分子サイトケラチンモノクローナル抗体(34βE12)(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・細胞中のヒトケラチン/サイトケラチン1、5、10、14の染色。

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の代わりに、ヒストファイン プロテアーゼ溶液(Code: 415231)にて5-15分間(25℃)処理することで良好な染色が得られる場合がある。■**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℃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) Gown AM, et al. Monoclonal antibodies to intermediate filament proteins of human cells: unique and cross-reacting antibodies. J Cell Biol. 1982 Nov;95(2 Pt 1):414-24.
- (2) Gown AM, et al. Monoclonal antibodies to human intermediate filament proteins. II. Distribution of filament proteins in normal human tissues. Am J Pathol. 1984 Feb;114(2):309-21.
- (3) Gown AM, et al. Monoclonal antibodies to human intermediate filament proteins. III. Analysis of tumors. Am J Clin Pathol. 1985 Oct;84(4):413-24.
- (4) O'Malley FP, et al. Usefulness of immunoperoxidase staining with high-molecular-weight cytokeratin in the differential diagnosis of small-acinar lesions of the prostate gland. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol. 1990;417(3):191-6.
- (5) Shah RB, et al. Usefulness of basal cell cocktail (34betaE12 + p63) in the diagnosis of atypical prostate glandular proliferations. Am J Clin Pathol. 2004 Oct;122(4):517-23.
- (6) Kunju LP, et al. Prostate-specific antigen, high-molecular-weight cytokeratin (clone 34betaE12), and/or p63: an optimal immunohistochemical panel to distinguish poorly differentiated prostate adenocarcinoma from urothelial carcinoma. Am J Clin Pathol. 2006 May;125(5):675-81.
- (7) Ng VW, et al. Is triple immunostaining with 34betaE12, p63, and racemase in prostate cancer advantageous? A tissue microarray study. Am J Clin Pathol. 2007 Feb;127(2):248-53.

*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): オートクレーブ処理

- ① 調製した抗原賦活化液(下記記載)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。
- ③ 120℃、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)。

[染色手順] <ヒストファイブ 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。

・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。 |