



研究用試薬

ヒストファイン

第一抗体

抗 WT1モノクローナル抗体(6F-H2)

(動物種：マウス)

包装：50テスト(6mL)

Code：413861

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 Wilms' Tumor 1 Protein(WT1 タンパク(52-54kD)、WT：ウィルムス腫瘍^{注1})と特異的に反応する。癌抑制遺伝子として作用する転写因子である、WT1 遺伝子の突然変異が、腫瘍の発生に関連している。WT1 遺伝子は、胎児においては、腎臓、中皮、生殖腺、脾臓などで発現している。成人では、腎臓の足細胞、精巣のセルトリ細胞、卵巣の顆粒膜細胞で発現している。腫瘍では、ウィルムス腫瘍、悪性中皮腫他、多くの腫瘍に反応がみられる。

注1：ウィルムス腫瘍(腎芽細胞腫)は、小児の腹部悪性腫瘍の一つである腎の胎児性癌である。0~3歳までに発症することが多い小児癌。

■ クローン名：6F-H2

■ 抗体のクラス/サブクラス：IgG1

■ 免疫原：ヒト WT1 の N 末端アミノ酸 1-181 に対応するタンパク質

■ 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 WT1モノクローナル抗体(6F-H2)(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 WT1 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(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(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。

■ 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) Haber DA, et al. WT1: a novel tumor suppressor gene inactivated in Wilms' tumor. *New Biol.* 1992 Feb;4(2):97-106.
- (2) Menssen HD, et al. E. Presence of Wilms' tumor gene (wt1) transcripts and the WT1 nuclear protein in the majority of human acute leukemias. *Leukemia.* 1995 Jun;9(6):1060-7.
- (3) Kumar-Singh S, et al. WT1 mutation in malignant mesothelioma and WT1 immunoreactivity in relation to p53 and growth factor receptor expression, cell-type transition, and prognosis. *J Pathol.* 1997 Jan;181(1):67-74.
- (4) Rauscher FJ 3rd, et al. Characterization of monoclonal antibodies directed to the amino-terminus of the WT1, Wilms' tumor suppressor protein. *Hybridoma.* 1998 Apr;17(2):191-8.
- (5) Carpentieri DF, et al. The expression of WT1 in the differentiation of rhabdomyosarcoma from other pediatric small round blue cell tumors. *Mod Pathol.* 2002 Oct;15(10):1080-6.
- (6) Goldstein NS, et al. WT1 immunoreactivity in uterine papillary serous carcinomas is different from ovarian serous carcinomas. *Am J Clin Pathol.* 2002 Apr;117(4):541-5.
- (7) Chen BF, et al. Immunohistochemical expression of Wilms' tumor 1 protein in nephroblastoma. *J Chin Med Assoc.* 2004 Oct;67(10):506-10.
- (8) Timár J, et al. WT1 expression in angiogenic tumours of the skin. *Histopathology.* 2005 Jul;47(1):67-73.
- (9) Nakatsuka S, et al. Immunohistochemical detection of WT1 protein in a variety of cancer cells. *Mod Pathol.* 2006 Jun;19(6):804-14.

**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。
- ・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。 |