



研究用試薬

ヒストファイン

第一抗体

CD99モノクローナル抗体(013)

(動物種: マウス)

包装: 45テスト (1.8mL×3本) Code: 413879

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CD99抗原(別名: MIC2またはE2抗原)(30-32kDa)と特異的に反応する。CD99抗原は細胞膜および細胞質に存在する糖タンパクであり、X染色体の短腕とY染色体に存在するMIC2遺伝子の産物である。正常では、胎児B細胞などの一部を除くリンパ球、胸腺細胞および脾臓細胞に強く発現がみられる。腫瘍では、神経外胚葉を起源とする小円形細胞肉腫であるユーイング肉腫(Ewing's sarcoma: ES)の95%、未分化神経外胚葉性腫瘍(Primitive Neuro - Ectodermal Tumor: PNET)、末梢性神経上皮腫(peripheral neuroepithelioma: PN)において発現がみられるが、その他の小円形細胞腫瘍(small round cell tumor: SRCT)である神経芽細胞腫、悪性リンパ腫、横紋筋肉腫では、他の肉腫、癌腫、そして神経外胚葉性腫瘍と同様に発現はみられない。しかし、B-リンパ芽球型の悪性リンパ腫や滑膜肉腫、骨肉腫、横紋筋肉腫、線維形成性小細胞腫瘍の一部に発現がみられる場合がある。ES、PNETおよびPNとその他のSRCTとの判別に有用である。

■**国際抗体分類:** Fifth International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens (1993)でCD99に分類されている。

■**クローン:** O13

■**アイソタイプ:** IgG1

■**免疫原:** ヒト悪性黒色腫細胞株MeWo

■**製法:** マウスの腹水から精製して得ている。

1. 内容

第一抗体・・・CD99モノクローナル抗体(O13) (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1.8mLを含む。

2. 使用目的

組織・細胞中のCD99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を用いた熱による抗原賦活化処理(オートクレープ処理120℃、20分間)が必要である(裏面をご参照ください)。

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(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:** 組織の固定条件などによりヒストファイン 抗原賦活化液pH9の代わりに10mMクエン酸ナトリウム緩衝液(pH6.0)を用いることで、良好な染色結果が得られる場合がある。

※**注意:** 組織の固定状況などが染色結果に影響を及ぼすため学会など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

1. 2~8℃で保存すること。
2. 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。
3. 使用前に常温に戻すこと。
4. 使用後は速やかに冷蔵保存すること。
5. 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

1. 使用期限の過ぎた試薬は使用しないこと。
2. 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。
3. 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。
4. 本品の廃棄の際には、各施設や地域および国のルールに従い、適切に廃棄すること。
5. 本品は、動物由来成分を含むので、取扱いに注意すること。
6. 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。
7. ヒト由来の検体は、感染のおそれがあるので取扱いには十分注意し、医療廃棄物などに関する規定および水質汚濁防止法などの規制に従って処理するとともに、免疫染色を実施するにあたって関連技術および操作方法を十分習熟しておくこと。

6. 参考文献

- (1)Dracopoli NC, et al. Genes controlling gp25/30 cell-surface molecules map to chromosomes X and Y and escape X-inactivation. Am J Hum Genet. 1985 Jan;37(1):199-207.
- (2)Weidner N, et al. Immunohistochemical profile of monoclonal antibody O13: antibody that recognizes glycoprotein p30/32MIC2 and is useful in diagnosing Ewing's sarcoma and peripheral neuroepithelioma. Am J Surg Pathol. 1994 May;18(5):486-94.
- (3)Ozdemirli M, et al. B-Lymphoblastic lymphoma presenting as a solitary bone tumor and mimicking Ewing's sarcoma: a report of four cases and review of the literature. Am J Surg Pathol. 1998 Jul;22(7):795-804.
- (4)Gu M, et al. Cytokeratin immunoreactivity in Ewing's sarcoma: prevalence in 50 cases confirmed by molecular diagnostic studies. Am J Surg Pathol. 2000 Mar;24(3):410-6.

免疫染色における操作手順及び試薬の調製方法

■操作手順

[切片の準備]

1. 切片を3～6μmに薄切し、poly-L-lysineまたはシランなどの切片用接着剤をコーティングしたスライドに貼り付け、37℃の恒温器で十分に乾燥させる。
[脱パラフィン]

2. 脱パラフィン → 親水化 → PBS洗浄

[抗原賦活化処理(必要な場合)]

3. 前処理(抗原賦活化): 熱による抗原賦活化処理またはタンパク質分解酵素処理

[染色手順]

4. ブロッキング試薬(3%過酸化水素加メタノール)による処理 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. ヒストファイン シンブルステインMAX-POの添加・反応 30分間／常温 → PBS洗浄
7. 基質溶液(DAB)の添加・反応 5～20分間／常温 → 水洗
8. 対比染色
9. 非水溶性封入剤で封入

※留意事項

- ・抗原賦活化処理を必要としない場合は3.のプロセスを行わず、4.のプロセスに進む。
- ・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。

<前処理(抗原賦活化)方法>

□熱による抗原賦活化

・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、手袋など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。

・オートクレーブ処理

- ①調製した抗原賦活化液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、染色バットおよび抗原賦活化液などが高温になっている。これらを取り扱う際は、手袋など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。

・マイクロウェーブ(MW)処理

- ①調製した抗原賦活化液を耐熱性の染色バットに入れ、MW照射し沸騰させる。
- ②沸騰した抗原賦活化液に切片を浸し、MWを5分間照射する。必要であれば、MW照射をもう1～2回繰り返す。
※MW照射による沸騰で抗原賦活化液は蒸発する。蒸発により抗原賦活化液が減少し切片の乾燥が危惧される場合は、ビーカーなど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。
- ③染色バットごと切片を常温(15～25℃)に20分間以上放置し、ゆっくり熱を冷ます。
※MW処理後は、耐熱性の染色バットおよび抗原賦活化液などが高温になっている。これらを取り扱う際は、手袋などを使用し火傷に注意する。
- ④スライドを抗原賦活化液から取り出し、PBSで洗浄する。

□タンパク質分解酵素処理

・プロテアーゼによる抗原賦活化

- ①組織切片にヒストファイン プロテアーゼ溶液1～2滴を滴下し、25℃で5～15分間インキュベートする。
※第一抗体の種類や組織の固定条件などにより、37℃で5～15分間インキュベートすると良好な染色が得られる場合がある。
- ②PBSで洗浄する。

・トリプシンによる抗原賦活化

- ①組織切片にヒストファイン トリプシン溶液1～2滴を滴下し、37℃で10分間インキュベートする。
※第一抗体の種類や組織の固定条件などにより、37℃で5～15分間インキュベートすると良好な染色が得られる場合がある。
- ②PBSで洗浄する。

■試薬の調製方法

・抗原賦活化液pH9の調製方法

- ・抗原賦活化液pH9(Code: 415201)は即時使用可能な溶液に調製済。そのまま用いる。
- ・抗原賦活化液pH9(Code: 415211)は10倍濃縮の抗原賦活化液pH9である。必要量をはかり精製水で10倍に希釈する。

・10mM クエン酸ナトリウム緩衝液(pH6.0)の調製方法

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
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
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。

・プロテアーゼ溶液の調製方法

プロテアーゼ溶液(Code: 415231)は即時使用可能な溶液に調製済。そのまま用いる。

・トリプシン溶液の調製方法

トリプシン溶液(Code: 415101)はトリプシン濃縮液(試薬A)と希釈液(試薬B)から構成される。
トリプシン濃縮液(試薬A)：希釈液(試薬B)を1：3となるように調製し、十分に混和する。

・ブロッキング試薬(3%過酸化水素加メタノール)の調製方法

30%過酸化水素水をメタノールで10倍希釈する。

・PBSの調製方法

PBS(Code: 415223)を使用することを推奨する。PBS(粉末)9.55gを精製水に溶解して1Lとする。