



研究用試薬

ヒストファイブ

第一抗体

抗ケラチン/サイトケラチン5/6モノクローナル抗体

(動物種: マウス)

包装: 50 テスト (6mL)

Code: 418081

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:** ヒト組織中のタイプII(塩基性)に属するヒトケラチン5(58kDa)およびヒトケラチン6(56kDa)と特異的に反応する。ケラチンは、分子量(MW)によって低分子/高分子に、等電点(pI)によって、タイプI(酸性)、タイプII(塩基性~中性)に分類される細胞質タンパク質である。ヒトケラチン5は、中皮細胞、重層上皮細胞、移行上皮細胞などで発現しており、中皮以外の単層上皮細胞、腺上皮細胞やほとんどの非上皮細胞で発現していない。また、ヒトケラチン6は、増殖期の扁平上皮細胞で発現している。腫瘍では、悪性中皮腫⁽²⁾、扁平上皮癌に反応がみられ、腺癌とは反応しないことから、上皮型悪性中皮腫と肺腺癌⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁶⁾、低分化型扁平上皮癌と腺癌(肺、乳腺、大腸、前立腺、転移性他)⁽⁷⁾⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾のように形態による判別が困難な場合に有用な指標となる。また、乳腺腫瘍⁽⁵⁾⁽⁹⁾⁽¹²⁾や前立腺腫瘍⁽⁸⁾では、悪性度合の指標としても有用である。

※: 上皮型や腺房様に分化した中皮腫では陽性率が高いが、肉腫型や混合型などでは陰性や弱陽性となることがある。

■ クローン名: D5/16 B4

■ 抗体のサブクラス: IgG1

■ 免疫原: 精製したサイトケラチン5

■ 製法: 腹水から得ている。

1. 内容

第一抗体・・・抗ケラチン/サイトケラチン5/6モノクローナル抗体(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・細胞中のケラチン/サイトケラチン5/6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)としてヒストファイブ 抗原賦活化液pH9(Code:415201またはCode:415211)にて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、ヒストファイブ 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1:** 組織の固定状況等により抗原賦活化液 pH9(Code: 415201またはCode: 415211)の代わりに10mMクエン酸緩衝液(pH6.0)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)。■ **参考2:** 前処理(抗原賦活化)の後に、3%過酸化水素水を用いて、脱ペルオキシダーゼ処理(10分間)を行うと、発色強度が低下する場合がある。その場合は、下記のいずれかの方法にて処理を行うこと。なお、3%過酸化水素加メタノールを用いる場合は、発色強度には影響がない(裏面の■操作手順参照)。

1) 3%過酸化水素水を用いた脱ペルオキシダーゼ処理を10分間行った後、前処理(抗原賦活化)を行う。

2) 前処理(抗原賦活化)を行った後、3%過酸化水素水を用いた脱ペルオキシダーゼ処理を5分間行う。

3) 前処理(抗原賦活化)を行った後、0.3%過酸化水素水を用いた脱ペルオキシダーゼ処理を10分間行う。

4) 脱ペルオキシダーゼ処理を行わない。ただし、内因性のペルオキシダーゼに起因するバック染色が血球などに生じる場合があるので注意する。

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) Roland M., et al : Cell 31 : 11-24, 1982
- (2) Clover J., et al : Histopathology 31 : 140-143, 1997
- (3) Ordóñez NG. : Am J Surg Pathol. 22 : 1203-1214, 1998
- (4) Ordóñez NG. : Am J Surg Pathol. 22 : 1215-1221, 1998
- (5) Otterbach F., et al : Histopathology 3793 : 232-240, 2000
- (6) Cury PM., et al : Mod Pathol. 13 : 107-112, 2000
- (7) Chu PG., et al : Mod Pathol. 15 : 6-10, 2002
- (8) Abarahams NA., et al : Am J Clin Pathol. 120 : 368-376, 2003
- (9) Lacroix-Triki M., et al : Virchows Arch. 442 : 548-554, 2003
- (10) Reis-Filho JS., et al : Virchows Arch. 443 : 122-132, 2003
- (11) Lin L., et al : J Cutan Pathol. 30 : 114-117, 2003
- (12) Joseph T.R., et al : Hum Pathol. 37 : 787-793, 2006

■ 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℃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℃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。
 - 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、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(M)使用の場合>

4. 3%過酸化水素加メタノールを用いた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。
- ・抗原賦活性化液pH9の作り方

- | |
|---|
| <ul style="list-style-type: none">・ Code : 415201 抗原賦活性化液pH9 (調製済)は、そのまま用いる。・ Code : 415211 抗原賦活性化液pH9 (10倍濃縮)は、精製水で10倍希釈する。 |
|---|

■ 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)

- ・ 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</p> <p>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</p> |
|--|

ここから必要な時に調製する。