



研究用試薬

## ヒストファイン

第一抗体

### 抗LY6Kモノクローナル抗体

(動物種：マウス)

包装：0.1mL (未希釈抗体) Code：418161

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 LY6K (Lymphocyte antigen 6 complex, locus K) と特異的に反応する。LY6K は保存部位に 10 個のシステイン残基を有し、低分子量の GPI アンカー型タンパク質と高い相同性を有する LY6 ファミリーに属しており、腫瘍の細胞増殖に重要な役割をしていると考えられている。染色は細胞質と細胞膜にみられる。腫瘍では、肺がん、食道がん他多くの腫瘍において反応がみられる。特に、肺がん：腺癌 86.2%(219/254)、扁平上皮癌 92.0%(103/112)、大細胞癌 85.7%(24/28)、食道がん 95.1%(252/265)では高い陽性率が報告されている<sup>(1)</sup>。これら腫瘍において生存率等の予後因子としての有用性が示唆されている。

※正常では、胃、小腸、腎臓、胎盤、骨格筋等に反応がみられることが The Human Protein Atlas<sup>(7)</sup>: TISSUE ATLAS(LY6K)に報告されている。

■クローン名：TA1975-146

■抗体のサブクラス：IgG1  $\kappa$ 

■免疫原：19 アミノ酸残基からなるペプチド

■製法：培養上清をアフィニティー精製して得ている。

#### 1. 内容

第一抗体・・・抗 LY6K 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)中に溶解された状態である。

1バイアル中に0.1mLを含む。

#### 2. 使用目的

組織・細胞中のヒト LY6K 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。

抗体は、抗体希釈用緩衝液(例 0.1%BSA、0.1%NaN<sub>3</sub>を含むPBS)を用いて25-100倍に希釈する。

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ン 抗原賦活化液pH9(Code:415201またはCode:415211)にて温浴処理が必要である(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  $\mu$  L)滴下し、常温(15-25°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。

■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またはCode：415211)を用いた温浴処理の代わりに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. 貯法および使用上の注意

1. 2-8°C保存。

2. 長期保存する場合は、頻回の凍結融解を避けるために小分け分注して冷凍保存(-20°C以下)すること。

3. 使用前に室温に戻すこと。

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. 取扱上(危険防止)の注意

1. 本製品に関する安全情報は安全データシートを参照すること。

2. 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。

3. 本製品の廃棄の際には、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。

4. 本品は、動物由来成分を含むので、取扱に注意が必要である。

5. アジ化ナトリウムは有毒化学薬品である。本製品の含有量は危険なものとして分類されないが、蓄積されたアジ化ナトリウムは爆発性の金属アジ化物として形成され、水道管に含まれる銅、鉛と反応する可能性がある。そのようなリスクを避けるために大量の水とともに洗い流すこと。

6. 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. 参考文献

- (1) N. Ishikawa, et al.: Cancer Res 67, 11601-11611, 2007
- (2) T. Suda, et al.: Cancer Sci 98(NO. 11), 1803-1808, 2007
- (3) Y. Mizukami, et al.: Cancer Sci 99(NO. 7), 1448-1454, 2008
- (4) K. Kono, et al.: Cancer Sci 100(NO. 8), 1502-1509, 2009
- (5) M. Iwahashi, et al.: Cancer Sci 101(NO. 12), 2510-2517, 2010
- (6) R. Matsuda, et al.: British Journal of Cancer 104, 376-386, 2011
- (7) Kampf C., et al.: J Vis Exp. 31(63). pii: 3620, 2012

■ 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): 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、軍手等を用いて高温に気をつける。
    - ② 緩衝液(下記記載)を調製し、耐熱性染色ドーズに入れて蓋をする。これを温浴槽に入れ、95-99℃に温める。(ドーズは温浴終了まで、水分蒸発を防ぐため、蓋をしておく。)
    - ③ ②の緩衝液が95-99℃に達したら、スライドを緩衝液に浸漬させ、ゆるくふたをする。
    - ④ 緩衝液の温度が再び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 染色ドーズ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。
- ※ 温浴処理後は、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. 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

■ 参考: 抗原賦活化液pH9、オートクレーブ処理を用いる場合(おもて面の■参考参照)

[切片の準備]

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℃、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)。

### ■ 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。
- ・ 抗原賦活化液pH9の作り方

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