



## 研究用試薬

## ヒストファイン

## 第一抗体

## 抗シアル化HEG1モノクローナル抗体(SKM9-2)

(動物種: マウス)

包装: 50テスト(6mL)

Code: 418231

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:** ヒトシアル化HEG1(Sialylated HEG1)タンパク質と特異的に反応する。シアル化HEG1は、HEG1(分子量約150kD)のN末端側の細胞外ドメインに存在する長いSer/Thr(セリン/スレオニン) rich領域に多数のシアル化O型糖鎖が結合した膜型ムチン様タンパク質である。本抗体は、Ser/Thr rich領域内のシアル化された<sup>893</sup>SKSPSLVSLPT<sup>903</sup>の配列を認識する。シアル化HEG1の機能は不明であるが、特に悪性中皮腫細胞の細胞膜や細胞質に発現がみられる。悪性中皮腫では感度92%、特異度99%で発現がみられ、既知の中皮腫マーカーより、感度、特異度が高いことが報告されている<sup>(1)</sup>。正常組織では、ほとんど発現はみられないが、毛細血管内皮や反応性中皮細胞などに発現がみられる場合がある。悪性中皮腫において、シアル化HEG1の発現の有無を既知の中皮腫マーカーと同時に検出することは、中皮腫の判別の信頼性を更に高めるうえで非常に有用である。

■ クローン名: SKM9-2

■ 抗体のクラス/サブクラス: IgG1

■ 免疫原: 中皮腫細胞株 ACC-MESO4

■ 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・・・抗シアル化HEG1モノクローナル抗体(SKM9-2)(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・細胞中のヒトシアル化HEG1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 $\mu$ 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。

■参考1: 組織の固定条件等により前処理(抗原賦活化)として10mMクエン酸緩衝液(pH6.0)を用いたオートクレーブ処理で良好な染色結果が得られる場合がある。(裏面の■参考1参照)

■参考2: 組織の固定条件等により前処理(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)を用いた温浴処理で良好な染色結果が得られる場合がある。(裏面の■参考2参照)

■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。
- \*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。
- 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。
- \*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) Tsuji S, et al. HEG1 is a novel mucin-like membrane protein that serves as a diagnostic and therapeutic target for malignant mesothelioma. Sci Rep. 2017 Mar 31;7:45768.

### \*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  |

#### ■ 参考1: 10mM クエン酸緩衝液(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: 常温で保存可能 クエン酸一水和物 (C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> · H <sub>2</sub> O) 2.1g/精製水 100mL
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 (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> Na <sub>3</sub> · 2H <sub>2</sub> O) 14.7g/精製水 500mL
ここから必要な時に調製する。

#### ■ 参考2: ヒストファイン 抗原賦活化液pH9 (Code:415201又はCode:415211)を用いた温浴処理を用いる場合

##### 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、手袋等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(上記参照)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(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)