

研究用試薬

## ヒストファイン

第一抗体

### 抗 p16<sup>INK4a</sup> モノクローナル抗体 (JC8)

(動物種：マウス)

包装： 50 テスト (6mL) Code : 418351

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 p16<sup>INK4a</sup> タンパク質と特異的に反応する。p16<sup>INK4a</sup> タンパク質は、9番染色体短腕 (9p21) 上の *CDKN2A* (Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A) 遺伝子によりコードされる<sup>(1)</sup>。CDK阻害因子のINK4ファミリーに属し、細胞周期の進行を調節するがん抑制タンパク質である<sup>(2)</sup>。正常では、増殖期子宮内膜、乳管上皮、扁桃の陰窩上皮のほか、膵臓のランゲルハンス島、下垂体前葉などの一部の内分泌器官に反応がみられ、主に細胞の核に反応がみられるが、p16<sup>INK4a</sup> を発現する細胞の多くは細胞質にも反応がみられる<sup>(1)</sup>。腫瘍では、高リスク型HPV (Human Papilloma Virus) 感染に関連した子宮頸癌<sup>(3)</sup>や中咽頭扁平上皮癌<sup>(4)</sup>でp16<sup>INK4a</sup>の過剰発現がみられることがある。また、尿路上皮癌<sup>(5)</sup>や大腸癌<sup>(6)</sup>でも発現がみられることがある。p16<sup>INK4a</sup>の免疫組織化学染色は、子宮頸部の扁平上皮内病変 (SIL<sup>\*</sup>) /子宮頸部上皮内腫瘍 (CIN<sup>\*\*</sup>) の組織学的分類の補助<sup>(7)</sup>や前癌病変と未熟扁平上皮化生、萎縮、反応性/炎症性病変などとの判別において有用である<sup>(3)(8)(9)</sup>。

注1：p16<sup>INK4a</sup>を発現している細胞では、核の他に細胞質にも弱～強程度の染色がみられることがある。

注2：腫瘍内および腫瘍に隣接する反応性の線維芽細胞および内皮細胞等に発現がみられることがある。

\*SIL：Squamous intraepithelial lesions \*\*CIN：Cervical intraepithelial neoplasia

■ クローン名：JC8

■ 抗体のサブクラス：IgG2a

■ 免疫原：ヒト p16<sup>INK4a</sup> 全長リコンビナントタンパク質

■ 製法：アフィニティー精製して得ている。

#### 1. 内容

第一抗体・・・抗 p16<sup>INK4a</sup> モノクローナル抗体 (JC8) (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)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 p16<sup>INK4a</sup> タンパク質の染色。

#### 3. 使用方法

パラフィン包埋切片の免疫組織化学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ン 抗原賦活化液 pH9 (Code:415201 または Code:415211)を用いた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 $^{\circ}$ 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：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)の代わりに 10mM クエン酸緩衝液 (pH6.0)を用いた温浴処理をすることで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 $^{\circ}$ C保存。

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. 使用期限の過ぎた試薬は使用しないこと。
2. 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。
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。
5. 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。
6. 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。
7. 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) Nielsen GP, et al. Immunohistochemical survey of p16INK4A expression in normal human adult and infant tissues. Lab Invest. 1999 Sep;79(9):1137-43.
- (2) Romagosa C, et al. p16(Ink4a) overexpression in cancer: a tumor suppressor gene associated with senescence and high-grade tumors. Oncogene. 2011 May 5;30(18):2087-97.
- (3) Jedpiyawongse A, et al. Immunohistochemical overexpression of p16 protein associated with cervical cancer in Thailand. Asian Pac J Cancer Prev. 2008 Oct-Dec;9(4):625-30.
- (4) Shelton J, et al. p16 immunohistochemistry in oropharyngeal squamous cell carcinoma: a comparison of antibody clones using patient outcomes and high-risk human papillomavirus RNA status. Mod Pathol. 2017 Sep;30(9):1194-1203.
- (5) Yang CH, et al. Expressions of p16 and p27 in urothelial carcinoma and their prognostic value. Kaohsiung J Med Sci. 2014 Sep;30(9):453-8.
- (6) Al-Ahwal M, et al. p16 protein is upregulated in a stepwise fashion in colorectal adenoma and colorectal carcinoma. Saudi J Gastroenterol. 2016 Nov;22(6):435-440.
- (7) Stoler MH, et al. Routine Use of Adjunctive p16 Immunohistochemistry Improves Diagnostic Agreement of Cervical Biopsy Interpretation: Results From the CERTAIN Study. Am J Surg Pathol. 2018 Aug;42(8):1001-1009.
- (8) Darragh TM, et al. The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization Project for HPV-Associated Lesions: background and consensus recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. Arch Pathol Lab Med. 2012 Oct;136(10):1266-97.
- (9) Kalof AN, et al. Our approach to squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix. J Clin Pathol. 2007 May;60(5):449-55.

### ■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°C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°C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): 温浴処理

- ① 温浴槽をあらかじめ95-99°C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(下記記載)を耐熱性の染色パットに入れ、ゆるく蓋をする。これを恒温槽に入れ、95-99°Cに温める。
- ③ 抗原賦活化液の温度が95-99°C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°Cまで上昇したことを温度計で確認してから、40分間、95-99°Cでインキュベートする。
- ⑤ 染色パ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°C)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、また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、また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。 |

■参考: 10mM クエン酸緩衝液(pH6.0)、温浴処理を用いる場合(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)

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。