



研究用試薬

ヒストファイン

第一抗体

抗 PRAME ウサギモノクローナル抗体 (EPR20330)

(動物種：ウサギ)

包装：50 テスト (6mL)

Code：418421

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 PRAME(preferentially expressed antigen in melanoma)タンパクと特異的に反応する。PRAME は染色体 22q11.22 上の PRAME 遺伝子にコードされる 509 アミノ酸からなる腫瘍抗原で⁽¹⁾⁽²⁾、RA/RAR(レチノイン酸/レチノイン酸受容体)シグナル伝達経路を阻害することにより腫瘍形成に寄与すると考えられている^{(3)~(5)}。正常では、精巣及び増殖期の子宮内膜などの細胞の核に反応がみられる⁽⁶⁾。腫瘍では皮膚の従来型悪性黒色腫(末端黒子型、表在拡大型、結節型、悪性黒子型)(約 90%)、線維形成性黒色腫(35%)などで反応がみられる⁽⁷⁾。また、唾液腺腺様嚢胞癌(81%)、胸腺癌(75%)、卵巣明細胞癌(90%)、子宮内膜癌(82%)、セミノーマ(78%)などにも反応がみられる⁽⁶⁾。PRAME の免疫組織化学染色は、正常な皮膚のメラノサイト(メラニン色素産生細胞)に反応がみられないことから悪性黒色腫の辺縁評価の補助に使用できること、また色素性の母斑(通常型の後天性母斑、異形成母斑、Spitz 母斑など)と悪性黒色腫との判別に有用であることが報告されている⁽⁷⁾。

注) PRAME が発現している細胞では、核の他に細胞質にも弱～中程度の染色がみられることがある。

■クローン名：EPR20330

■抗体のクラス/サブクラス：ウサギIgG

■免疫原：ヒト PRAME の C 末端側から 100 番目までのアミノ酸配列の一部に相当するリコンビナントタンパク質

■製法：培養上清より、プロテイン A アフィニティークロマトグラフィーを用いて精製して得ている。

1. 内容

第一抗体・・・抗 PRAME ウサギモノクローナル抗体(EPR20330) (動物種：ウサギ)。

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 PRAME タンパクの染色。

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 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、ヒストファイン シンプルステインMAX-PO(R)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. 取扱い上(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。
- 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。
- 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。
- 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) Wadelin F, et al. Leucine-rich repeat protein PRAME: expression, potential functions and clinical implications for leukaemia. Mol Cancer. 2010 Aug 27;9:226.
- (2) Ikeda H, et al. Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expressing an NK inhibitory receptor. Immunity. 1997 Feb;6(2):199-208.
- (3) Epping MT, et al. The human tumor antigen PRAME is a dominant repressor of retinoic acid receptor signaling. Cell. 2005 Sep 23;122(6):835-47.
- (4) Xu Y, et al. The role of the cancer testis antigen PRAME in tumorigenesis and immunotherapy in human cancer. Cell Prolif. 2020 Mar;53(3):e12770.
- (5) Lezcano C, et al. Busam KJ. PRAME Immunohistochemistry as an Ancillary Test for the Assessment of Melanocytic Lesions. Surg Pathol Clin. 2021 Jun;14(2):165-175.
- (6) Kaczorowski M, et al. PRAME Expression in Cancer. A Systematic Immunohistochemical Study of >5800 Epithelial and Nonepithelial Tumors. Am J Surg Pathol. 2022 Nov 1;46(11):1467-1476.
- (7) Lezcano C, et al. PRAME Expression in Melanocytic Tumors. Am J Surg Pathol. 2018 Nov;42(11):1456-1465.

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): 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(下記参照)を耐熱性の染色バットに入れ、ゆるく蓋をする。これを恒温槽に入れ、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)。

[染色手順] <ヒストファイン シンプルステインMAX-PO(R)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(R)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、又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: 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を用いる場合
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(上記記載)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)。