



HISTOFINE

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: 15テスト (1.8mL)

Code: 418428

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)~(6)}。正常では、精巣および増殖期の子宫内膜などの細胞の核に反応がみられる⁽⁷⁾。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、唾液腺様嚢胞癌(81%)、胸腺癌(75%)、卵巣明細胞癌(90%)、子宫内膜癌(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: EPR20330

■アイソタイプ: 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1.8mL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を用いた熱による抗原賦活化処理(温浴処理95～99℃、40分間)が必要である(裏面をご参照ください)。

スライド上の組織切片が完全に覆わるように第一抗体を2滴(100μL)滴下し、常温(15～25℃)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: 組織の固定条件などにより温浴処理の替わりにオートクレーブ処理(120℃、20分間)を行うことで、良好な染色結果が得られる場合がある。

※注意: 組織の固定状況などが染色結果に影響を及ぼすため学会など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

1. 2～8℃で保存すること。
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. 使用前に常温に戻すこと。
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. 取扱い上(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。
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、取扱いに注意すること。
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、感染のおそれがあるので取扱いには十分注意し、医療廃棄物などに関する規定および水質汚濁防止法などの規制に従って処理するとともに、免疫染色を実施するにあたって関連技術および操作方法を十分習熟しておくこと。

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試薬の調製方法

■操作手順

[切片の準備]

1. 切片を3~6μmに薄切り、poly-L-lysineまたはシランなどの切片用接着剤をコーティングしたスライドに貼り付け、37°Cの恒温器で十分に乾燥させる。

[脱パラフィン]

2. 脱パラフィン → 親水化 → PBS洗浄

[抗原賦活化処理(必要な場合)]

3. 前処理(抗原賦活化): 热による抗原賦活化処理またはタンパク質分解酵素処理

[染色手順]

4. ブロッキング試薬(3%過酸化水素加メタノール)による処理 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. ヒストファイン シンプルスティンMAX-POの添加・反応 30分間／常温 → PBS洗浄
7. 基質溶液(DAB)の添加・反応 5~20分間／常温 → 水洗
8. 対比染色
9. 非水溶性封入剤で封入

※留意事項

- ・抗原賦活化処理を必要としない場合は3.のプロセスを行わず、4.のプロセスに進む。
- ・4.のプロセスは3.の前に行つてもよい。
- ・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。

<前処理(抗原賦活化)方法>

□熱による抗原賦活化

・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、手袋など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°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°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。

・オートクレーブ処理

- ①調製した抗原賦活化液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。
- ③120°C、20分間オートクレーブ処理する。
- ④圧力が十分がった後、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°C)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、染色バットおよび抗原賦活化液などが高温になっている。これらを取り扱う際は、手袋など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。

・マイクロウェーブ(MW)処理

- ①調製した抗原賦活化液を耐熱性の染色バットに入れ、MW照射し沸騰させる。
- ②沸騰した抗原賦活化液に切片を浸し、MWを5分間照射する。必要であれば、MW照射をもう1~2回繰り返す。
※MW照射による沸騰で抗原賦活化液は蒸発する。蒸発により抗原賦活化液が減少し切片の乾燥が危惧される場合は、ビーカーなどであらかじめ沸騰させておいた精製水を減少した分だけ加えてからMW照射を行うこと。
- ※MW照射を1回(照射時間10~15分間程度)のみで行つても良い。
- ③染色バットごと切片を常温(15~25°C)に20分間以上放置し、ゆっくり熱を冷ます。
- ※MW処理後は、耐熱性の染色バットおよび抗原賦活化液などが高温になっている。これらを取り扱う際は、手袋などを使用して火傷に注意する。
- ④スライドを抗原賦活化液から取り出し、PBSで洗浄する。

□タンパク質分解酵素処理

・プロテアーゼによる抗原賦活化

- ①組織切片にヒストファイン プロテアーゼ溶液1~2滴を滴下し、25°Cで5~15分間インキュベートする。
※第一抗体の種類や組織の固定条件などにより、37°Cで5~15分間インキュベートすると良好な染色が得られる場合がある。
- ②PBSで洗浄する。

・トリプシンによる抗原賦活化

- ①組織切片にヒストファイン トリプシン溶液1~2滴を滴下し、37°Cで10分間インキュベートする。
※第一抗体の種類や組織の固定条件などにより、37°Cで5~15分間インキュベートすると良好な染色が得られる場合がある。
- ②PBSで洗浄する。

■試薬の調製方法

・抗原賦活化液pH9の調製方法

- ・抗原賦活化液pH9(Code: 415201)は即時使用可能な溶液に調製済。そのまま用いる。
- ・抗原賦活化液pH9(Code: 415211)は10倍濃縮の抗原賦活化液pH9である。必要量をはかり精製水で10倍に希釈する。

・10mM クエン酸ナトリウム緩衝液(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
クエン酸一水和物 ($C_6H_5O_7 \cdot H_2O$) 2.1g/精製水 100mL
B 液: 0.1M クエン酸ナトリウム水溶液
クエン酸三ナトリウム二水和物 ($C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$) 14.7g/精製水 500mL
ここから必要な時に調製する。

・プロテアーゼ溶液の調製方法

プロテアーゼ溶液(Code: 415231)は即時使用可能な溶液に調製済。そのまま用いる。

・トリプシン溶液の調製方法

トリプシン溶液(Code: 415101)はトリプシン濃縮液(試薬A)と希釈液(試薬B)から構成される。
トリプシン濃縮液(試薬A): 希釈液(試薬B)を1:3となるように調製し、十分に混和する。

・ブロッキング試薬(3%過酸化水素加メタノール)の調製方法

30%過酸化水素水をメタノールで10倍希釈する。

・PBSの調製方法

PBS(Code: 415223)を使用することを推奨する。PBS(粉末)9.55gを精製水に溶解して1Lとする。