



研究用試薬

ヒストファイン

第一抗体

抗Oct-3/4モノクローナル抗体(N1NK)

(動物種: マウス)

包装: 45テスト (1.8mL × 3本) Code: 418459

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Oct-3/4(Octamer-binding protein 3/4)タンパク質と特異的に反応する。Oct-3/4 (別名: Oct-3、Oct4、POU5F1)は染色体6p21.3上の *POU5F1* 遺伝子にコードされる18kDaのPOUドメイン転写因子で、胚性幹細胞および初期胚細胞の自己複製と多能性の維持に関与している^{(1)~(3)}。正常では、胚から胎児の生殖細胞系列の細胞の核に反応がみられるが、それらの細胞の分化に伴い発現量は低下し、成人の生殖細胞では反応がみられない^{(3)~(6)}。腫瘍では、性腺芽腫や胚細胞腫瘍の一部で反応がみられる⁽⁴⁾。胚細胞腫瘍においては、GCNIS、セミノーマ/未分化胚細胞腫(ディスジャーミノーマ)/胚細胞腫(ジャーミノーマ)、胎児性癌で反応がみられるが、卵黄嚢腫瘍、絨毛癌などでは反応がみられないため、胚細胞腫瘍の組織型分類に有用である^{(4)(7)(8)~(10)}。

注)Oct-3/4が発現している細胞では、核の他に細胞質にも染色がみられることがある。

※GCNIS: Germ cell neoplasia *in situ*

■クローン: N1NK

■アイソタイプ: IgG1

■免疫原: ヒトOct-3/4のN末端側から147番目までのアミノ酸配列に相当するリコンビナントタンパク質

■製法: 培養上清より得ている。

1. 内容

第一抗体・・・抗Oct-3/4モノクローナル抗体(N1NK) (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1.8mLを含む。

2. 使用目的

組織・細胞中のOct-3/4タンパク質の染色。

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れ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(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: 組織の固定条件などにより温浴処理の代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

- 2~8℃で保存すること。
- 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。
- 使用前に常温に戻すこと。
- 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、各施設や地域およ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、取扱いに注意すること。
- 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)Kellner S, et al. Transcriptional regulation of the Oct4 gene, a master gene for pluripotency. *Histol Histopathol*. 2010 Mar;25(3):405-12.
- (2)Rizzino A. Sox2 and Oct-3/4: a versatile pair of master regulators that orchestrate the self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2009 Sep-Oct;1(2):228-236.
- (3)Hattab EM, Tu PH, Wilson JD, Cheng L. OCT4 immunohistochemistry is superior to placental alkaline phosphatase (PLAP) in the diagnosis of central nervous system germinoma. *Am J Surg Pathol*. 2005 Mar;29(3):368-71.
- (4)Looijenga LH, et al. POU5F1 (OCT3/4) identifies cells with pluripotent potential in human germ cell tumors. *Cancer Res*. 2003 May 1;63(9):2244-50.
- (5)Rajpert-De Meyts E, et al. Diagnostic markers for germ cell neoplasms: from placental-like alkaline phosphatase to micro-RNAs. *Folia Histochem Cytobiol*. 2015;53(3):177-88.
- (6)Rajpert-De Meyts E, et al. Developmental expression of POU5F1 (OCT3/4) in normal and dysgenetic human gonads. *Hum Reprod*. 2004 Jun;19(6):1338-44.
- (7)Ulbricht TM, et al: Members of the ISUP Immunohistochemistry in Diagnostic Urologic Pathology Group. Best practices recommendations in the application of immunohistochemistry in testicular tumors: report from the International Society of Urological Pathology consensus conference. *Am J Surg Pathol*. 2014 Aug;38(8):e50-9.
- (8)Looijenga LHJ, et al. Report From the International Society of Urological Pathology (ISUP) Consultation Conference on Molecular Pathology of Urogenital Cancers: IV: Current and Future Utilization of Molecular-Genetic Tests for Testicular Germ Cell Tumors. *Am J Surg Pathol*. 2020 Jul;44(7):e66-e79.
- (9)Già N, et al. Ovarian Germ Cell Tumors: Pictorial Essay. *Diagnostics (Basel)*. 2022 Aug 24;12(9):2050.
- (10)Mei K, et al. Diagnostic utility of SALL4 in primary germ cell tumors of the central nervous system: a study of 77 cases. *Mod Pathol*. 2009 Dec;22(12):1628-36.

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に薄切し、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℃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): 熱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 シンブルステイン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。

<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℃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℃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。

・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℃、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)のみで行っても良い。
- ③染色バットごと切片を常温(15～25℃)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℃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℃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℃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℃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 (C₆H₅O₇・H₂O) 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 (C₆H₅O₇Na₃・2H₂O) 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。