



研究用試薬

ヒストファイン

第一抗体

抗ケラチン/サイトケラチン19モノクローナル抗体(A53-B/A2.26)

(動物種：マウス)

包装：50テスト(6mL)

Code：418461

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：ヒトケラチン/サイトケラチン19タンパク質と特異的に反応する。ケラチンは上皮細胞において中間径フィラメント(IF)を形成するタンパク質で、分子量(MW)によって低分子と高分子に、等電点(pI)によってタイプI(酸性)とタイプII(塩基性～中性)に分類される⁽¹⁾⁽²⁾。ケラチン19はタイプI(酸性)に属する低分子ケラチンで、分子量はケラチンでは最小のMW: 約40kDaである⁽¹⁾⁻⁽⁴⁾。正常では、消化管、胆管、呼吸器、尿路系、唾液腺など幅広い組織分布を示し、組織中のほとんどの単層上皮、多層上皮、移行上皮、重層上皮で細胞質に発現がみられるが、重層扁平上皮においては、食道などの非角化重層扁平上皮では特に基底細胞に強く発現がみられ、皮膚の角化重層扁平上皮細胞では発現がみられない⁽¹⁾⁽³⁾⁻⁽⁵⁾。また、肝細胞、膵腺房細胞などでは発現がみられない⁽¹⁾⁽³⁾⁻⁽⁵⁾。腫瘍では、膵臓、大腸、食道、胃などの腺癌のほか、乳がん、尿路上皮がん、胆管癌、甲状腺癌の一部などでも発現がみられる⁽³⁾⁽⁶⁾。胆管上皮細胞マーカーとして使用されるケラチン19は、胆管癌と肝細胞癌を判別するのに有用であると報告されている⁽⁴⁾⁽⁷⁾⁽⁸⁾。また肝細胞癌ではほとんど発現がみられないが、発現がみられる場合は肝細胞癌の予後予測に役立つと報告されている⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁷⁾⁽⁹⁾。

■クローン名：A53-B/A2.26

■アイソタイプ：IgG2a, κ

■免疫原：ヒト乳がん細胞株MCF-7

■製法：Protein A/Gで精製して得ている。

1. 内容

第一抗体・・・抗ケラチン/サイトケラチン19モノクローナル抗体(A53-B/A2.26)(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・細胞中のヒトケラチン/サイトケラチン19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(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：組織の固定条件等により、前処理(抗原賦活化)として抗原賦活化液pH9(Code:415201又はCode:415211)を用いた温浴処理の代わりにプロテアーゼ溶液(Code:415231)を用いて25 $^{\circ}$ Cで5分間タンパク質分解酵素処理することで良好な染色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) Moll R, et al. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. Cell. 1982 Nov;31(1):11-24.
- (2) Karantza V. Keratins in health and cancer: more than mere epithelial cell markers. Oncogene. 2011 Jan 13;30(2):127-38.
- (3) Menz A, et al. Diagnostic and prognostic impact of cytokeratin 19 expression analysis in human tumors: a tissue microarray study of 13,172 tumors. Hum Pathol. 2021 Sep;115:19-36
- (4) Moll R, et al. The human keratins: biology and pathology. Histochem Cell Biol. 2008 Jun;129(6):705-33.
- (5) Bártek J, et al. Differential expression of keratin 19 in normal human epithelial tissues revealed by monospecific monoclonal antibodies. Histochem J. 1986 Oct;18(10):565-75.
- (6) Liu Z, et al. Significance of CK19, TPO, and HBME-1 expression for diagnosis of papillary thyroid carcinoma. Int J Clin Exp Med. 2015 Mar 15;8(3):4369-74.
- (7) Jain R, et al. The use of Cytokeratin 19 (CK19) immunohistochemistry in lesions of the pancreas, gastrointestinal tract, and liver. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2010 Jan;18(1):9-15.
- (8) Takahashi Y, et al. Application of Immunohistochemistry in the Pathological Diagnosis of Liver Tumors. Int J Mol Sci. 2021 May 28;22(11):5780.
- (9) Zhuo JY, Lu D, Tan WY, Zheng SS, Shen YQ, Xu X. CK19-positive Hepatocellular Carcinoma is a Characteristic Subtype. J Cancer. 2020 Jun 28;11(17):5069-5077.

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. 切片を3-6 μ mに薄切し、poly-L-lysine又はシラン等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 $^{\circ}$ 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

[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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ Cに温める。
- ③抗原賦活化液の温度が95-99 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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、又は洗浄びんを使用する)。

・抗原賦活化液の調製

「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。

[染色手順] <ヒストファイน์ シンプルステインMAX-PO(M)使用の場合>

4. ブロッキング試薬による処理(3%過酸化水素加メタノール) 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(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

※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น์SAB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。

※参考: プロテアーゼ溶液(Code:415231)を用いる場合(おもて面の※参考参照)

前処理(抗原賦活化): タンパク質分解酵素処理

プロテアーゼ溶液(Code:415231)を用いて、25 $^{\circ}$ Cで5分間反応させる。 → PBS洗浄