



研究用試薬

ヒストファイン

第一抗体

抗ヒト *c-erbB-2* 遺伝子産物ポリクローナル抗体

(動物種: ウサギ)

包装: 1mL (未希釈抗体)

Code: 413421

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: gp185 のヒト *c-erbB-2* 遺伝子産物 (HER2) の細胞内ドメインと特異的に反応し、gp170 の EGF レセプターとは反応しない。ヒト *c-erbB-2* 遺伝子導入細胞の SV11、SV227、A415 と反応し、また、ヒト培養細胞株では胃癌由来の MKN7、組織では、腺癌、特に乳癌あるいは胃癌の一部と強く反応する。ただし、正常の腺組織とも弱く反応する。

■製法: ①免疫原・・・*c-erbB-2* 遺伝子産物の C 末端ペプチド(Thr-Ala-Glu-Asn-Pro-Glu-Tyr-Leu-Gly-Leu-Asp-Val-Pro-Val)の Thr に Cys を結合したペプチドをウシ血清アルブミン(BSA)に結合させたもの。

②免疫法・・・免疫原をウサギに免疫して抗血清を得ている。

■精製法: ウサギ IgG 粗分画より、上記ペプチドでアフィニティー精製している。

1. 内容

第一抗体・・・抗ヒト *c-erbB-2* 遺伝子産物ポリクローナル抗体 (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)中に溶解された状態である。

1 バイアル中に未希釈抗体 1mL を含む。

2. 使用目的

組織・細胞中のヒト *c-erbB-2* 遺伝子産物の染色。

*3. 使用方法

パラフィン包埋切片の免疫組織化学染色、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、抗体希釈用緩衝液(例0.1% BSA、0.1% NaN_3 を含むPBS)を用いて100-200倍に希釈する。前処理(抗原賦活化)として10mMクエン酸緩衝液(pH6.0)を用いたオートクレーブ処理が必要である(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 μL)滴下し、常温(15-25 $^{\circ}\text{C}$)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: 組織の固定状況等によりオートクレーブ処理の代わりにマイクロウェーブ処理をすることで、より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 $^{\circ}\text{C}$ 保存。
2. 長期保存する場合は、頻回の凍結融解を避けるために小分け分注して冷凍保存(-20 $^{\circ}\text{C}$ 以下)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. 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。
2. 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。
3. 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。
4. 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。
5. 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。
6. 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. 主要文献

- (1) Mori,S.,et al. : Virchows Arch B. 54, 8-15, 1987
- (2) Mori,S.,et al. : Lab. Invest. 61, 93-97, 1989

■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℃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。
2. 脱パラフィン → 親水化 → PBS
3. 前処理(抗原賦活化): オートクレーブ処理
 - ① 緩衝液(下記記載)を耐熱性バットに入れ、切片を浸す。
 - ② 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、バットごと切片を取り出す。
 - ⑤ バットの蓋をはずし、バットごと切片を常温に20分以上放置し、ゆっくり熱を冷ます。※オートクレーブ処理後は、バットおよび緩衝液等が高温になっている。これらを取り扱う際は、手袋等を使用し火傷に注意する。
 - ⑥ スライドを緩衝液から取り出し、PBSでよくすすぐ(3分間ずつ容器を2度かえるか、または洗浄ビンを使用する)。

[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PBSに浸し、5分間ずつ3回放置する。
- ・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。

- ・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 ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) 2.1g/精製水 100mL

B液: 0.1M クエン酸ナトリウム水溶液: 常温で保存可能

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。

- 参考: 10mMクエン酸緩衝液(pH6.0)、マイクロウェーブ処理を用いる場合(おもて面の■参考参照)

前処理(抗原賦活化): マイクロウェーブ(MW)処理

①緩衝液を耐熱性バットに入れ、MW照射し沸騰させる。

②沸騰した緩衝液に切片を浸し、MWを5分間照射する。

③再度、MWを5分間照射する。必要であれば、さらにもう一回、MWを5分間照射する。

※MW照射による沸騰で緩衝液は蒸発する。蒸発により緩衝液が減少し、切片の乾燥が危惧される場合は、ビーカー等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。

④バットごと切片を常温(15-25℃)に20分以上放置し、ゆっくり熱を冷ます。

※MW処理後は、バットおよび緩衝液等が高温になっている。これらを取り扱う際は、手袋等を使用し火傷に注意する。

⑤スライドを緩衝液から取り出し、PBSにて洗浄する。