



研究用試薬

## ヒストファイブ

第一抗体

## 抗 BAP1 モノクローナル抗体 (C-4)

(動物種：マウス)

包装：50テスト (6mL) Code：418341

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：BAP1(BRCA1 associated protein 1)と特異的に反応する。BAP1は、3番染色体短腕(3p21.1)上の*BAP1*遺伝子によりコードされる核に局在する脱ユビキチン化酵素で、転写、クロマチンリモデリング、細胞周期制御、DNA修復/組換えなどに関与している<sup>(1)-(4)(6)-(8)</sup>。生殖細胞系列における*BAP1*変異は、悪性中皮腫やブドウ膜悪性黒色腫など様々な悪性腫瘍の素因になるとされているため、*BAP1*はがん抑制遺伝子としても報告されている<sup>(2)(6)(7)</sup>。正常では、中皮細胞、肺胞上皮細胞<sup>(6)</sup>や血管内皮細胞、線維芽細胞、炎症性細胞<sup>(6)-(8)</sup>などの核に反応がみられる。腫瘍では、肺癌、卵巣癌などで反応がみられる<sup>(6)</sup>。悪性中皮腫(66%<sup>(6)</sup>)では、免疫組織化学染色でBAP1の核からの消失(BAP1 loss)がみられるが、反応性中皮過形成ではBAP1 lossがみられないことから、悪性中皮腫と反応性中皮過形成の判別において有用であると報告されている<sup>(6)</sup>。悪性中皮腫の組織型では、上皮型(70%) / 二相型(60%)が、肉腫型(13%) / 線維形成型(20%)と比較して、BAP1 lossが高率であると報告されている<sup>(6)</sup>。ブドウ膜悪性黒色腫(47%)<sup>(4)</sup>、肝内胆管癌(26%)<sup>(7)</sup>、淡明細胞型腎細胞癌(10%)<sup>(5)</sup>などの悪性腫瘍でも、BAP1 lossがみられる。

注1：BAP1が発現している細胞では、核の他に細胞質に染色がみられる場合がある。

注2：BAP1 lossを示す細胞では、核の染まりは消失しているが細胞質に染色がみられる場合がある。

■クローン名：C-4

■抗体のサブクラス：IgG1、 $\kappa$ 

■免疫原：ヒト BAP1 のアミノ酸配列 430-729 番目に相当するタンパク質

■製法：アフィニティー精製して得ている。

## 1. 内容

第一抗体・・・抗 BAP1 モノクローナル抗体(C-4) (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)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 BAP1 の染色。

## 3. 使用方法

パラフィン包埋切片の免疫組織化学および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、前処理(抗原賦活化)としてヒストファイブ 抗原賦活化液 pH9 (Code:415201 または 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 $\mu$ 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、ヒストファイブ 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：組織の固定状況等によりヒストファイブ 抗原賦活化液 pH9(Code：415201 または Code：415211)の代わりに 10mM クエン酸緩衝液(pH6.0)を用いた温浴処理をすること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)。

## 4. 貯法および使用上の注意

- 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。
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。
5. 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。
6. 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。
7. 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. 参考文献

- (1) Jensen DE, et al. BAP1: a novel ubiquitin hydrolase which binds to the BRCA1 RING finger and enhances BRCA1-mediated cell growth suppression. *Oncogene*. 1998 Mar 5;16(9):1097-112.
- (2) Testa JR, et al. Germline BAP1 mutations predispose to malignant mesothelioma. *Nat Genet*. 2011 Aug 28;43(10):1022-5.
- (3) Ismail IH, et al. Germline mutations in BAP1 impair its function in DNA double-strand break repair. *Cancer Res*. 2014 Aug 15;74(16):4282-94
- (4) Koopmans AE, et al. Clinical significance of immunohistochemistry for detection of BAP1 mutations in uveal melanoma. *Mod Pathol*. 2014 Oct;27(10):1321-30.
- (5) Ho TH, et al. Loss of PBRM1 and BAP1 expression is less common in non-clear cell renal cell carcinoma than in clear cell renal cell carcinoma. *Urol Oncol*. 2015 Jan;33(1):23.e9-23.e14.
- (6) Cigognetti M, et al. BAP1 (BRCA1-associated protein 1) is a highly specific marker for differentiating mesothelioma from reactive mesothelial proliferations. *Mod Pathol*. 2015 Aug;28(8):1043-57.
- (7) Andrici J, et al. Loss of BAP1 Expression Occurs Frequently in Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Medicine (Baltimore)*. 2016 Jan;95(2):e2491.
- (8) Hida T, et al. BAP1 immunohistochemistry and p16 FISH results in combination provide higher confidence in malignant pleural mesothelioma diagnosis: ROC analysis of the two tests. *Pathol Int*. 2016 Oct;66(10):563-570.

### ■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(下記記載)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、また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(M)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(M)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、また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.までを行い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: 10mM クエン酸緩衝液 (pH6.0)、温浴処理を用いる場合(おもて面の■参考参照)

- ・ 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<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> · H<sub>2</sub>O) 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<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Na<sub>3</sub> · 2H<sub>2</sub>O) 14.7g/精製水 500mL  
ここから必要な時に調製する。