



MONOCLONAL ANTIBODIES PRODUCED  
BY THE RAT LYMPH NODE METHOD

For research use only

## Fluorochrome-conjugated MoAbs for Alport's syndrome

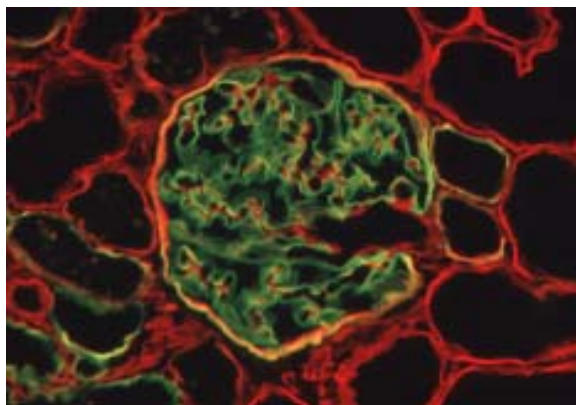
FITC-Anti Collagen IV  $\alpha 5(\text{IV})$  Chain, Human (Mono)  
+ Texas Red-Anti Collagen IV  $\alpha 2(\text{IV})$  Chain, Human (Mono)

Code: SGE-CFT45325

Quantity: 1.0 ml

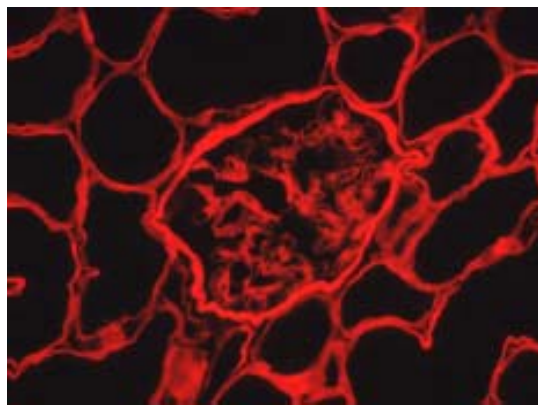
This product can be used for staining of human renal and skin biopsy sections very easily and rapidly because two monoclonal antibodies are conjugated with two different fluorochromes. FITC-conjugated-anti  $\alpha 5(\text{IV})$  demonstrates presence or absence of the  $\alpha 5(\text{IV})$  chain, and Texas Red -anti  $\alpha 2(\text{IV})$  reveals the renal basement membrane structure.

Alport's syndrome, an inherited disease, shows absence or reduction of the  $\alpha 5(\text{IV})$  chain in the glomerular, tubular and Bowman's capsular basement membranes. Normal human kidney has  $\alpha 1(\text{IV})$  to  $\alpha 6(\text{IV})$  chains in the renal basement membranes.



Double exposure of normal human kidney section stained with the product.

FITC fluorescence ( $\alpha 5$  chain) is observed in the GBM, part of the TBM and Bowman's capsular BM. BMs where two fluorochromes are present look orange to yellow.



Double exposure of Alport human kidney section stained with the product.

Because no FITC fluorescence ( $\alpha 5$  chain) is observed in the kidney of the patient with X-linked Alport's syndrome, only Texas Red fluorescence ( $\alpha 2$  chain) is confirmed.



MONOCLONAL ANTIBODIES PRODUCED  
BY THE RAT LYMPH NODE METHOD

---

---

## Fluorochrome-conjugated MoAbs for Alport's syndrome

FITC-Anti Collagen IV  $\alpha 5(\text{IV})$  Chain, Human (Mono)

+ Texas Red-Anti Collagen IV  $\alpha 2(\text{IV})$  Chain, Human (Mono)

<b>For research use only</b>
------------------------------

---

Product name: Fluorochrome-conjugated MoAbs for Alport's syndrome

Code: SGE-CFT45325

Quantity: 1.0 ml

Appearance: Solution. Monoclonal antibodies were purified by affinity chromatography. The monoclonal antibodies against  $\alpha 5(\text{IV})$  were conjugated with FITC (H53 & B51), and the monoclonal antibody against  $\alpha 2(\text{IV})$ , with Texas Red (H25). 0.1%  $\text{NaN}_3$  is added for preservation.

Clone names: H53 (rat IgG2a/kappa, B51 (rat IgG2a), & H25 (rat IgG1/kappa)

Specificity of antibodies: H53 is specific to imperfection III of  $\alpha 5(\text{IV})$  (Reference 1); B51 is specific to NC1 domain of  $\alpha 5(\text{IV})$  (Reference 2); H25 is specific to imperfection XIII of  $\alpha 2(\text{IV})$  (Reference 1).

Preparation of antibodies : Monoclonal antibodies were prepared by the rat lymph node method developed by Shigei Medical Research Institute with synthetic peptides and native NC1 domain of type IV collagen as immunogens.

use : Staining of human cryostat sections by direct immunofluorescence (No acid-urea treatment is necessary.)

Storage : In dark at 2-4°C, or in freezing at below -30°C. Stable at these conditions for several years

Reference : 1) Kagawa et al. (1997) Nephrol. Dial. Transplant. 12: 1238-1241  
2) Borza DB et al. (2001) J. Biol. Chem. 276: 28532-28540

Producer : Shigei Medical Research Institute  
2117 Yamada, Okayama 701-0202, Japan  
TEL: +81-86-282-3113; FAX: +81-86-282-3115  
E-mail: inst@shigei.or.jp

---



## How to use SGE-CFT45325

● SGE-CFT45325 is prepared to stain human cryostat sections of renal and skin biopsy specimens by direct immunofluorescence.

### How to stain human kidney cryostat sections

Just put 20-50  $\mu$ l of the staining solution on cryostat sections, incubate them for 30 min at room temperature. After washing them with PBS, mount them and observe them with a fluorescence microscope.

**Caution:** Do not use stale cryostat sections.

Do not fix sections with any fixatives.

Do not dilute the staining solution.

### How to stain human skin cryostat sections

After acetone treatment of cryostat sections for 5 min, put 20-50  $\mu$ l of the staining solution on them, and incubate them for 60 min in a moisture chamber at room temperature. After washing them with PBS, mount them and observe them with a fluorescence microscope.

**Caution:** Do not use stale cryostat sections.

Do not fix sections with any fixatives.

Do not dilute the staining solution.

● In case that a section is not stained or stained in a mosaic pattern with FITC-anti- $\alpha$ 5(IV) but the background staining of Texas Red-anti- $\alpha$ 2(IV) is normally stained  
The disease is diagnosed as Alport's syndrome.

**Caution:** Human skin basement membrane is a thin membrane and sometimes staining of  $\alpha$ 5(IV) is very weak.

For accurate diagnosis, it is important to consider clinical symptoms. In case that the staining is not clear, it is necessary to make additional staining with other monoclonal antibodies against type IV collagen.

Correspondence: Yoshikazu Sado, Ph.D.

Shigei Medical Research Institute, 2117 Yamada, Okayama 701-0202, Japan;

TEL: +81-86-282-3113, FAX: +81-86-282-3115, E-mail: sado@shigei.or.jp


## References:

- 1) Kagawa M et al. (1997) Epitope-defined monoclonal antibodies against type-IV collagen for diagnosis of Alport's syndrome. Nephrol. Dial. Transplant. 12: 1238-1241.
- 2) Yoshioka K et al. (1994) Type IV collagen  $\alpha$ 5 chain: Normal distribution and abnormalities in X-linked Alport syndrome revealed by monoclonal antibody. Am. J. Pathol. 144: 986-996.
- 3) Ninomiya Y et al. (1995) Differential expression of two basement membrane collagen genes, COL4A6 and COL4A5, demonstrated by immunofluorescence staining using peptide-specific monoclonal antibodies. J. Cell Biol. 130: 1219-1229.
- 4) Naito I et al. (1996) Relationship between COL4A5 gene mutation and distribution of type IV collagen in male X-linked Alport syndrome. Kidney Int. 50: 304-311.



MONOCLONAL ANTIBODIES PRODUCED  
BY THE RAT LYMPH NODE METHOD

しげい  
重井医学研究所 〒701-0202 岡山市山田2117  
TEL: 086-282-3113, FAX: 086-282-3115  
E-mail: inst@shigei.or.jp

 コスモ・バイオ株式会社

研究用

## アルポート症候群研究用蛍光色素標識抗体

FITC標識抗ヒトIV型コラーゲン 5鎖抗体

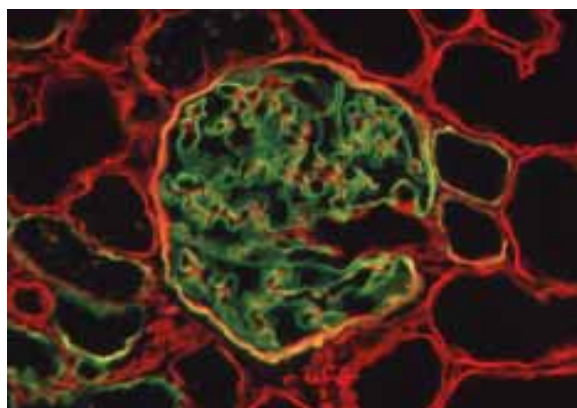
+ Texas Red標識抗ヒトIV型コラーゲン 2鎖抗体

FITC-Anti Collagen IV  $\alpha 5(\text{IV})$  Chain, Human (Mono)

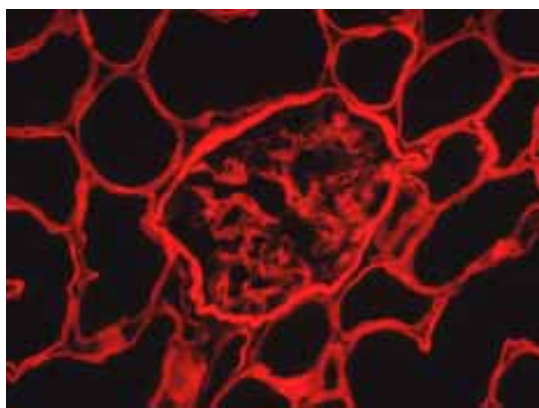
+ Texas Red-Anti Collagen IV  $\alpha 2(\text{IV})$  Chain, Human (Mono)

2種類の蛍光色素により標識されている本試薬(1バイアル・デュアルカラー)を生検腎凍結切片に載せるだけのワンステップで(直接蛍光抗体法)簡単、迅速に染色ができます。FITC標識した抗 5鎖抗体により4型コラーゲンの 5鎖の有無と染色の程度が、さらに、Texas Red標識した抗 2鎖抗体により腎臓の構造を容易に確認できます。

遺伝性腎症であるアルポート症候群の腎基底膜(系球体基底膜、尿細管基底膜、ボウマン嚢基底膜)においては、4型コラーゲンの 3鎖、4鎖、5鎖の欠損、減少が報告されています。正常ヒト腎臓基底膜においては4型コラーゲンの 1鎖から 6鎖までの 鎖が存在しています。



正常腎臓を本染色液で染色後、二重露光撮影:系球体基底膜、ボウマン嚢および一部の尿細管基底膜がFITCで染色されている。Texas Redの赤い染色が重なってところは橙色から黄色に見える。



男性アルポート症候群の腎臓を本染色液で染色後、二重露光撮影:FITCが認められないためTexas Redのみが認められる。

メーカー略号: SGE

品名: アルポート症候群研究用蛍光色素標識抗体

品番: CFT- 45325

包装: 1.0 ml

コスモ・バイオ株式会社



MONOCLONAL ANTIBODIES PRODUCED  
BY THE RAT LYMPH NODE METHOD

日本語 060524

しげい  
重井医学研究所 〒701-0202 岡山市山田2117  
TEL: 086-282-3113, FAX:086-282-3115  
E-mail: inst@shigei.or.jp

研究用

---

## アルポート症候群研究用蛍光色素標識抗体

FITC標識抗ヒトIV型コラーゲン 5鎖抗体  
+ Texas Red標識抗ヒトIV型コラーゲン 2鎖抗体

---

- 品 名: アルポート症候群研究用蛍光色素標識抗体
- 品 番: CFT-45325
- 包 装: 1.0 ml
- 性 状: 液体冷蔵品。培養上清をアフィニティカラムで精製し、精製抗体に FITC (H53 と B51) ならびに Texas Red (H25) を標識したものです。保存のために 0.1% の NaN<sub>3</sub> を加えています。
- クローン名: H53 (rat IgG2a/kappa, B51 (rat IgG2a), & H25 (rat IgG1/kappa)
- 特 異 性: H53 はヒト4型コラーゲン 5鎖の imperfection III と特異的に反応し、ヒト 1鎖、2鎖、3鎖、4鎖、6鎖とは反応しません。エピトープはアミノ酸配列で IDVEF です (文献1)。B51 はヒト4型コラーゲン 5鎖の NC1 領域と特異的に反応し、ヒト 1鎖、2鎖、3鎖、4鎖、6鎖とは反応しません (文献2)。H25 はヒト4型コラーゲン 2鎖の imperfection XIII と特異的に反応し、ヒト 1鎖、3鎖、4鎖、5鎖、6鎖とは反応しません (文献1)。
- 抗体の作製方法: モノクローナル抗体は重井医学研究所が開発したラットリンパ節法を用いて作製しました。ラットを免疫する抗原として合成ペプチドならびにウシ腎臓から精製した4型コラーゲンを用いました。
- 用 途: 腎臓凍結切片の直接蛍光抗体法による染色 (酸性処理の必要がありません。)
- 保 存: 遮光状態の4℃の冷蔵保存、または、-30℃以下で凍結保存してください。この状態で数年間は安定です。
- 文 献: 1) Kagawa et al. (1997) Nephrol. Dial. Transplant. 12: 1238-1241  
2) Borza DB et al. (2001) J. Biol. Chem. 276: 28532-28540
- 製 造 元: 重井医学研究所 〒701-0202 岡山市山田2117  
TEL 086-282-3113; FAX 086-282-3115; E-mail: inst @shigei.or.jp
-



## アルポート症候群研究用蛍光色素標識抗体の使用法

**CFT-45325試薬は腎臓凍結切片標本ならびに皮膚凍結切片標本を直接蛍光抗体法で染色することを目的に調製されています。**

**腎臓凍結切片標本と皮膚凍結切片標本では染色方法が異なります。**

皮膚基底膜は薄いため、確実に 5 鎖染色を行なうためにアセトン処理、ならびに60分間の染色を行なうことをお勧めします。

### A) 腎臓凍結切片の染色方法

- 1) スライドガラスに貼り付けた腎臓凍結切片に20～50  $\mu$ lの本試薬を載せ30分間反応させる。
- 2) PBSでよく洗浄後、封入して、蛍光顕微鏡で観察する。( 2鎖のTexas Red蛍光を確認し、染色が確実に行なわれていることを必ず確認して下さい。)

#### 染色上の注意点

- 1) 凍結切片は薄切直後の新鮮なものをお使い下さい。
- 2) 本試薬を薄めずに20～50  $\mu$ lを直接切片にのせて下さい。
- 3) 切片は固定しないで下さい。(アルコール、ホルマリンは不可:アセトンは可)  
(時間の経った切片、固定した切片では染色が薄くなります。本試薬を薄めた場合も染色が薄くなります。)

### B) 皮膚凍結切片の染色方法

- 1) スライドガラスに貼り付けた皮膚凍結切片をアセトンに5分間浸けます(アセトン処理)。
- 2) アセトン処理した切片をアセトンから出すとアセトンは速やかに蒸発します。蒸発後、その切片に20～50  $\mu$ lの本試薬を載せ60分間反応させる。(60分間の染色ですので染色液の蒸発を防ぐためモイスチャーチェンバーを使用して下さい。)
- 3) PBSでよく洗浄後、封入して、蛍光顕微鏡で観察する。( 2鎖のTexas Red蛍光を確認し、染色が確実に行なわれていることを必ず確認して下さい。)

#### 染色上の注意点

- 1) 凍結切片は薄切直後の新鮮なものをお使い下さい。
- 2) 本試薬を薄めずに使用して下さい。
- 3) 切片は固定しないで下さい。(アルコール、ホルマリンは不可)  
(時間の経った切片、固定した切片では染色が薄くなります。本試薬を薄めた場合も染色が薄くなります。)

## アルポート症候群研究用蛍光色素標識抗体の使用方法 (続き)

**(重要)系球体基底膜、一部の尿細管基底膜、ボウマン嚢基底膜、皮膚基底膜の 5鎖が染色されない場合、5鎖がモザイク状に染色される場合、または、5鎖の染色が著しく減少している場合、アルポート症候群の可能性あります。**

皮膚基底膜には部分的に極めて薄いところがあります。5鎖染色が極めて弱くしか染色されない場合がありますのでご注意ください。モザイクパターンの確認には5鎖染色が明瞭なところで判断をして下さい。モザイクパターンでは5鎖染色が明瞭に消失します。消失部位の幅は狭いこともあれば、かなり広い場合もあります。

**インターネットのホームページに本試薬を用いて染色した例が載っています。(google検索で重井医学研究所、アルポート症候群と入力してみてください。重井医学研究所(研究者の向け)のページが見つかると思います。その中にあります。)**

アルポート症候群の正確な診断には臨床症状があるかどうか、また、他のモノクローナル抗体による染色などから判断して下さい。ご不明の点がございましたら下記にご連絡をお願いいたします。

連絡先: 佐渡義一(さどよしかず) e-mail: sado@shigei.or.jp  
〒701-0202 岡山市山田2117  
重井医学研究所  
TEL 086-282-3113, FAX 086-282-3115

## 参考文献

- 1) Kagawa M et al. (1997) Epitope-defined monoclonal antibodies against type-IV collagen for diagnosis of Alport's syndrome. Nephrol. Dial. Transplant. 12: 1238-1241.
- 2) Ninomiya Y et al. (1995) Differential expression of two basement membrane collagen genes, COL4A6 and COL4A5, demonstrated by immunofluorescence staining using peptide-specific monoclonal antibodies. J. Cell Biol. 130: 1219-1229.
- 3) Naito I et al. (1996) Relationship between COL4A5 gene mutation and distribution of type IV collagen in male X-linked Alport syndrome. Kidney Int. 50: 304-311.
- 4) Borza DB et al. (2001) The NCI domain of collagen IV encodes a novel network composed of the alpha 1, alpha 2, alpha 5, and alpha 6 chains in smooth muscle basement membranes. J. Biol. Chem. 276: 28532-28540.