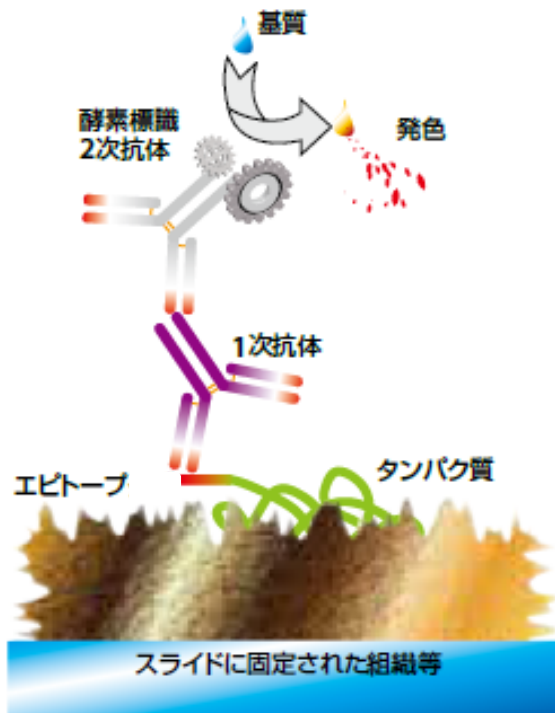


## 免疫組織化学染色（免疫染色）

### 免疫組織化学染色の原理



免疫組織化学的染色法は、組織中の特定の抗原を検出するための有益な実験法です。

ペルオキシダーゼ（HRP）またはアルカリホスファターゼで標識した二次抗体により、抗体反応を酵素的に検出します。

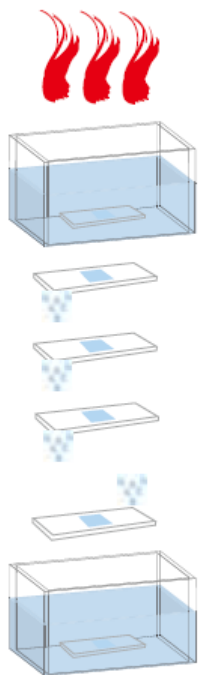
本手順は以下のステップから構成されます。

- パラフィン除去/再水和
- 抗原回復（シグナルが弱い場合のオプション）
- ペルオキシダーゼの不活化（HRP検出法を利用した場合）
- 一次抗体反応
- 二次抗体（またはExtravidin）反応
- 発色
- 対比染色（カウンターステイン）

### 使用する主な試薬

ホルマリン固定パラフィン包埋組織切片の免疫組織化学染色
PBS (10mM リン酸緩衝生理食塩水) pH7.4 (製品番号P3813 粉末またはP4417 錠剤など)
ウシ血清アルブミン (BSA) (製品番号A7906 粉末など)
1% BSA含有PBS (製品番号P3688 粉末)
キシレン
エタノール (製品番号09-0770)
トリプシン (製品番号T7409 粉末または製品番号T7168 錠剤)
プロテアーゼ (製品番号P5380 粉末)
クエン酸ナトリウム (製品番号S4641 粉末)
EDTA (製品番号E9884 粉末)
ペルオキシダーゼ系の場合：AEC染色キット (製品番号AEC101)、DAB (製品番号D4418 錠剤)
アルカリホスファターゼ系の場合：ファストレッドTR/ナフトールAS-MX (製品番号F4648 錠剤)
ハマトキシリン溶液マイヤー法 (製品番号MHS1)
コプリン染色ジャー (製品番号S5641)
一次抗体
二次抗体

## 免疫組織化学染色プロトコール例



### パラフィン除去／再水和

1. スライドを56 ~ 60℃のオープン内に15分間置きます。  
注意：オープンの温度は60℃を超えないようにします。
2. キシレン槽に写し、5分間ずつ2回キシレンを交換。
3. 余分な液を振り落とし、スライドを3分間ずつ2回、新鮮な100%エタノール中で再水和。
4. 余分な液を振り落とし、スライドを新鮮な90%エタノール中に3分間静置。
5. 余分な液を振り落とし、スライドを新鮮な80%エタノール中に3分間静置。
6. スライドを弱い流水で30秒間リンス。  
注意：直接強い水をあてると、洗い落としたり固定が緩くなることがあります。
7. PBS槽に静置し、さらに再水和させる（室温で30分間）。

続けて一次抗体の反応を行います。  
一次抗体反応の前にオプションとして抗原回復を行うか、HRP標識の場合はペルオキシダーゼの不活性化を行います。

### 抗原回復（シグナルが弱い場合のオプション）

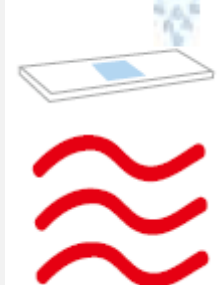
固定組織中では溶液中に比べて抗体がタンパク質エピトープが近づきにくいいため、酵素分解による抗原の回復ステップが必要なことがあります。このステップは染色が弱い場合や染色が認められないとき、または1次抗体の露出が必要な抗原について行います。

#### 酵素法



1. スライドを抗原回復液（0.1%トリプシン含有PBSまたは0.1%プロテアーゼ含有PBS）で37℃で2~30分間処理します。インキュベーションの時間を延長することで、特異的な染色が増強されることもあります。
2. 10分間PBSでリンス。

#### マイクロ波回復法



1. スライドを脱イオン水で洗浄し、抗原回復液の入ったマイクロウェーブ耐性プラスチック製の染色容器に入れます。
2. マイクロ波を高出力（約700W）で5分間照射。
3. この操作を2~3回繰り返して行う。
4. 室温に20分以上置きゆっくりと冷却してから次のステップへ進む。

スライドが完全に溶液で覆われるようにするのじゃよ

### ペルオキシダーゼの不活化（HRP標識を利用して検出する場合）



ペルオキシダーゼ標識の二次抗体またはExtrAvidin- ペルオキシダーゼを使用する場合、組織内在性のペルオキシダーゼによりバックグラウンドが生じることがあるため、ペルオキシダーゼの不活性化を行います。

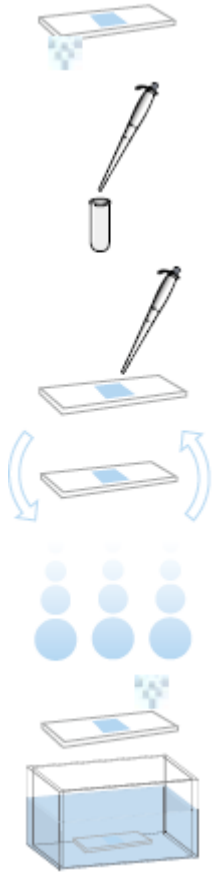
1. スライドを水平な場所に置く。注意：スライドが互いに触れ合ったり途中で乾燥しないようにして下さい。
2. 切片全体を覆うように3%過酸化水素水を滴下します。
3. 室温で5分間インキュベート。
4. 洗浄瓶を用いてPBSでリンスする。
5. スライドをPBS槽に2分間静置する。



2015年4月

## 免疫組織化学染色プロトコール例 続き

### 一次抗体反応



一次抗体反応の前に5% BSA (ウシ血清アルブミン) で10分間サンプルのスライドをインキュベート (ブロッキング) することで、バックグラウンドの染色を抑えることができます。

あるいは、動物組織の場合、二次抗体の宿主動物と同じ動物種からの正常血清を5~10%使用すると良好な結果が得られます。

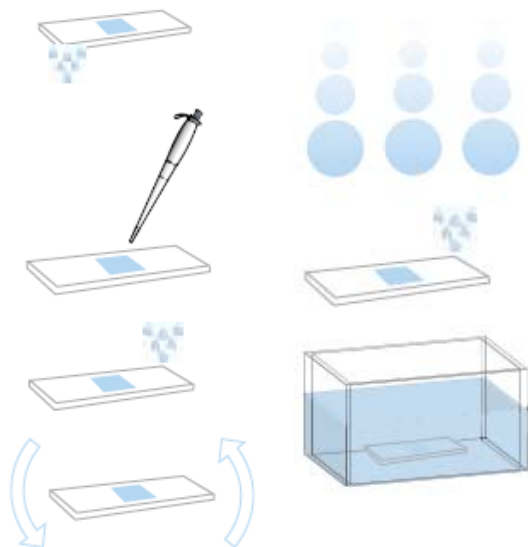
一次抗体ごとに至適な希釈倍率と反応時間は必ず使用前に検討してください。

一次抗体の希釈率の検討は特に重要じゃな



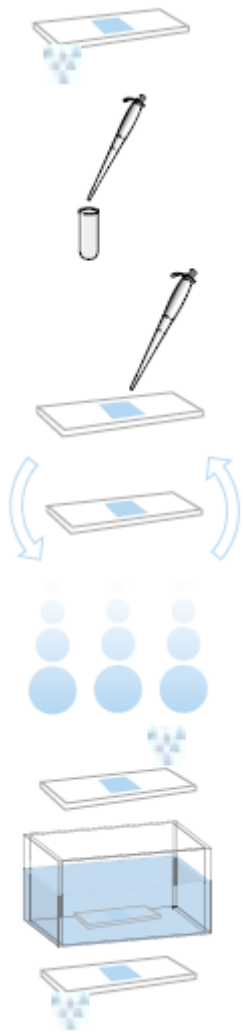
1. スライド上の余分な液体をよく振り落とし、スライドの切片に触れないように注意深く拭き取ります。
2. 一次抗体またはネガティブコントロールを、希釈液で希釈。ネガティブコントロールとして希釈液自体を用いることもあります。ポジティブコントロールのスライド (対象となる抗原の存在が既知である組織) を並行して行うことも染色結果の確認のために重要です。
3. スライドに100 $\mu$ Lの一次抗体を滴下し、組織切片を覆います。
4. スライドを2方向に傾けて、液をスライド全体に均一に広げます。
5. 加湿チャンバー内 (37 $^{\circ}$ C) で60分間以上インキュベート。抗原密度が低い場合には、インキュベーション時間を長くすることが推奨されます。
6. 洗浄瓶を用いてPBSで穏やかにリンスします。
7. スライドをPBS槽に入れ5分間静置。

### 二次抗体反応 (酵素標識二次抗体を用いる場合)

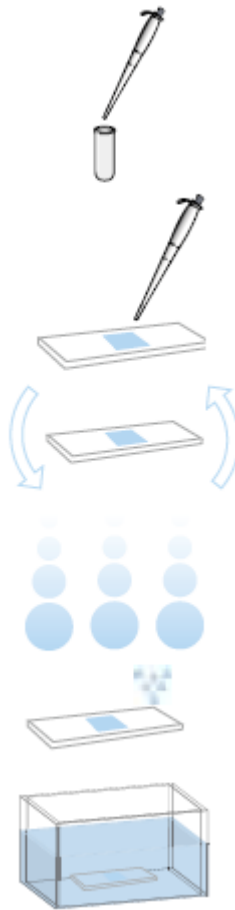


1. スライド上の余分な液体をよく振り落とし、スライドの切片に触れないように注意深く拭き取ります。
2. ペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ標識二次抗体を、希釈液で希釈します。
3. スライドに100 $\mu$ Lの二次抗体を滴下し、組織切片を覆います。
4. スライドを2方向に傾けて、液をスライド全体に均一に広げます。
5. 加湿チャンバー内 (37 $^{\circ}$ C) で30分間インキュベート。
6. 洗浄瓶を用いてPBSで穏やかにリンスします。
7. スライドをPBS槽に入れ5分間静置。検出用基質の混合液の調製は、この最終洗浄段階で行うことをお勧めします。

## 二次抗体反応 (ビオチン・ストレプトアビジン検出法を用いる場合)



1. スライド上の余分な液体をよく振り落とし、スライドの切片に触れないように注意深く拭き取ります。
2. ペルオキシダーゼ又はアルカリホスファターゼ標識二次抗体を、希釈液で希釈する。
3. スライドに100 $\mu$ Lの二次抗体を滴下し、組織切片を覆います。
4. スライドを2方向に傾けて、液をスライド全体に均一に広げます。
5. 加湿チャンバー内 (37 $^{\circ}$ C) で30分間インキュベート。
6. 洗浄瓶を用いてPBSで穏やかにリンスします。
7. スライドをPBS槽に入れ5分間静置。
8. 液を捨て、スライド上の余分な液体をよく振り落とし、スライドの切片に触れないように注意深く拭き取ります。



9. ストレプトアビジン/Extravidin複合体を、希釈液で至適濃度まで希釈します。
10. スライドに100 $\mu$ L滴下し、組織切片を覆います。
11. スライドを2方向に傾けて、液をスライド全体に均一に広げます。
12. 加湿チャンバー内 (室温) で20分以上インキュベート。
13. 洗浄瓶を用いてPBSで穏やかにリンスします。
14. スライドをPBS槽に5分間静置。検出用基質の混合液の調製は、この最終洗浄段階で行うことをお勧めします。
15. 発色に進みます。

## 発色



1. スライド上の余分な液体をよく振り落とし、スライドの切片に触れないように注意深く拭き取ります。
2. 用時調製した基質混合液を充分量滴下して組織切片を覆います。  
  
アルカリホスファターゼ基質溶液に1mMレバミゾール (製品番号L9756) を添加すると、腸アイソザイム以外の内在性アルカリホスファターゼの活性が大幅に抑制されます。
3. 5 ~ 10分間、又は顕微鏡でモニターしながら望ましい発色反応が認められるまでインキュベート。ネガティブコントロールでバックグラウンドが生じる前に洗浄瓶の蒸留水で穏やかにリンスし、反応を停止させます。

## 対比染色 (カウンターステイン)



1. 充分量のMayer's ヘマトキシリンを滴下して切片を覆うか、あるいはスライドをMayer's ヘマトキシリン槽に静置します。
2. ヘマトキシリンの含量に応じて、30秒～5分間インキュベート。
3. 洗浄瓶を用いて蒸留水で穏やかにスライドをリンスします。
4. スライドを弱い流水で5分間リンス。直接強い水をあてると、洗い落としたり固定が緩くなる場合があります。
5. グリセロールゼラチンなどの水性マウント剤を用いて切片をマウントする。透明なマニキュア液でカバーガラスをシールしてもよい。

AEC基質を使用して生じる色素は有機溶媒に可溶であるため、対比染色にアルコール含有溶液 (Harris' ヘマトキシリン、酸アルコールなど) を用いないようにして下さい。スライドを脱水したり、トルエン (またはキシレン) 中に入れたり、トルエンを含むマウント剤は使用しないで下さい。

# 抗体の実験にきっと役立つ基礎知識

## 免疫組織化学 トラブルシューティングガイド

問題点	考えられる原因	解決策
シグナルが検出されない または シグナルが弱い	抗体に認識されるエピトープが、組織サンプル中に発現していない	ウェスタンブロットあるいは他の方法によって、タンパク質/抗原の発現を確認して下さい。ご使用の一次抗体が、研究対象の動物種由来の目的タンパク質と反応しない場合があります。文献、製品データシートやアミノ酸配列に関する情報をチェックして下さい。
	抗体に認識されるエピトープが、過度の抗原の露出/回復処理により破壊されている	最適な処理方法を決定して下さい。
	抗体が至適濃度でない	希釈倍率を検討して、一次抗体の至適濃度を決定して下さい。もしシグナルが検出されない、または弱い場合は、使用抗体量を増加させて下さい。
	抗体のインキュベーション時間が十分でない	インキュベーション時間を長くして下さい。
	アルデヒド固定による架橋のため、一次抗体が認識エピトープと接触していない	プロテアーゼによる露出処理をご検討下さい。至適条件は経験的に決定されます。
	酵素活性が最適でない	基質とのインキュベーション時間を長くして下さい。ペルオキシダーゼの場合は、基質溶液中にアジ化ナトリウムが存在していないかを確認して下さい。
	基質や標識体が弱い、あるいは寿命が保存状態が原因で失活している	標識体と基質の活性を確認して下さい。例えば、基質溶液に酵素標識体を加えると、色が変わるはずです。
	使用する基質を誤っている、あるいは基質の調製を誤っている	ご使用の酵素標識体に対する基質の選択が適切であることを確認して下さい。基質に添付された製品データシートに従って下さい。必要な場合は新しいH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> を加えて確認して下さい。
バックグラウンドが高い	凝集している	マイクロ遠心機を最高速にして抗体を短時間遠心し、凝集した抗体を除去して下さい。
	抗体が至適濃度でない	希釈倍率を検討して、一次抗体および二次抗体の至適濃度を決定して下さい。バックグラウンドが高い場合は、抗体量を減らして下さい。
	抗体が細胞表面のFcγセプターに結合している、あるいは細胞成分に非特異的に結合している	サンプルを10%血清(二次抗体の宿主動物と同じ生物種由来の血清)とインキュベートし、標識抗体をアブライする前にFcγセプターを占有します。F(ab') <sub>2</sub> フラグメントの標識二次抗体をご使用いただくと、バックグラウンドの低減に役立ちます。
	洗浄が十分でない	洗浄の回数を増やすか、厳しい条件にして下さい。
	ブロッキングが適切でない	BSAまたは正常血清(二次抗体の宿主動物と同じ生物種由来)のインキュベーション時間を長くするか、濃度を高くして下さい。また、別のブロッキング試薬か、同じブロッキング試薬の新しいロットをご使用下さい。
	二次抗体が交差反応している	組織サンプルと同じ動物種の免疫グロブリン、または血清が吸収済みの二次抗体を用いて下さい。
	処理中にスライドが乾いている	加湿チャンバーでインキュベートし、切片の乾燥を避けて下さい。
	基質のインキュベーション時間が長い	基質の反応時間を短くして下さい。
	内在性酵素の阻害が十分でない	ペルオキシダーゼ系の場合は新しい過酸化水素、あるいはアルカリホスファターゼ系の場合はレバミゾールをご使用下さい。

2015年5月