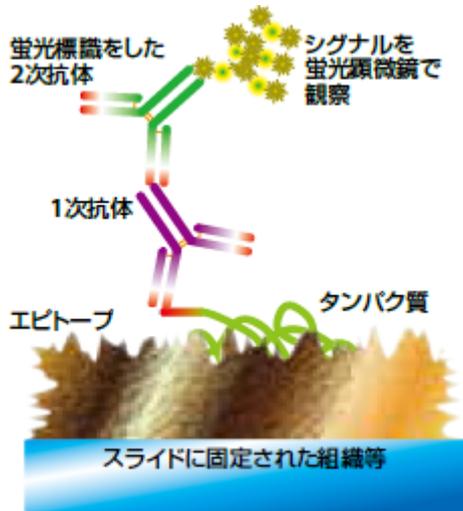


免疫蛍光染色（免疫蛍光法）

免疫蛍光染色の原理



免疫蛍光染色法（免疫蛍光法）は、細胞内のタンパク質局在の観察など非常に多用途に用いられる技術です。抗原が高度に局在化している場合、細胞に含まれる1,000程度の抗原分子も検出することができます。またイメージアナライザーを使った場合には抗原のおおよその濃度も求めることができます。

蛍光染色のおおまかなステップは次の通りです。

- 染色する細胞をプレートやスライドなどに接着
- 細胞の固定化・透過処理
- 抗体反応
- 顕微鏡による観察

使用する主な試薬・装置

PBS (0.01Mリン酸緩衝生理食塩水) pH 7.2~7.4	製品番号P4417を1錠200mLの脱イオン水に溶解
メタノール	事前に1時間以上-20℃で冷却。製品番号19-2410
アセトン	事前に1時間以上-20℃で冷却。製品番号534064
透過液 (0.5% トリトンX-100)	トリトンX-100 (製品番号T9284)
固定液 (3~4% パラホルムアルデヒド含有PBS溶液)	パラホルムアルデヒドはアルカリ性でないと溶けにくいので、5M NaOH溶液を用い適度に加熱しながらパラホルムアルデヒド (製品番号P6148) をPBS溶液に溶解し、溶解後pHをHCl溶液で中性付近に調節。用事調製。
PEMバッファー (5mM EGTA, 2mM MgCl ₂ ·6H ₂ O, 0.1M PIPES) pH 6.8	
一次抗体	
蛍光色素標識二次抗体	
水性マウント剤	Fluoromount™水性マウンティング媒体 (製品番号F4680)
顕微鏡用スライドガラス	
顕微鏡用カバーガラス	
蛍光検出用の適切なフィルター付きの蛍光顕微鏡	
倒立光学顕微鏡	

免疫蛍光染色の手順について

まず最初に、染色する細胞を固体の支持体に接着させて扱いやすくします。この接着方法にはいくつかの方法があり、接着細胞の場合はあらかじめ顕微鏡用のスライドガラスやカバーガラスまたは適当なプラスチック製の容器で増殖されることで、それぞれの表面に細胞が接着します。浮遊細胞の場合、細胞を遠心してスライドガラス上に貼り付け、化学的リンカーを使って固体支持体に結合させるか、または懸濁した状態で染色を行う場合もあります。

次に、細胞を固定して透過処理し、抗体がその抗原に近づけるようにします。固定が完全であれば、本来の細胞・細胞内構造を維持しながら抗原を固定化し、抗体があらゆる細胞・細胞内構造に障害なく近づくことができます。

適切な固定法は、検討する抗原の性質と使用する抗体の特性をもとに選択されますが、固定法はおおむね有機溶媒法と架橋試薬法の2つに分けられます。アルコールやアセトンなどの有機溶媒は、細胞構造上にタンパク質を沈降させながら脂質を取り除き、細胞を脱水させます。架橋試薬（パラホルムアルデヒドなど）は通常は遊離アミノ基を介して分子間に架橋を形成し、それにより連結した抗原のネットワークを形成します。架橋剤は有機溶媒よりも細胞構造をより適切に維持しますが、一部の細胞成分の抗原性を低下させることがあり、また検体への抗体のアクセスを可能にするためには、透過処理段階を追加する必要があります。

いずれの固定法もタンパク質抗原を変性する可能性があり、細胞染色には変性タンパク質に対する抗体の方が有用と考えられます。次のページ以降で4種類の固定法が紹介されていますので、その用途に応じて適切な固定法を選択して下さい。

細胞染色の第3段階として抗体反応を行います。洗浄により非結合抗体を除去してから、結合した抗体を直接検出するか（1次抗体が標識されている場合）、または蛍光標識二次試薬を使って間接的に検出します。

最後に、蛍光顕微鏡を使って染色を観察します。

抗体の実験にきっと役立つ基礎知識

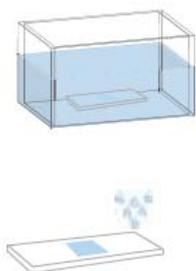
細胞の準備

顕微鏡用のスライドガラスやカバーガラス、プレートなどで培養して接着させた細胞を光学顕微鏡で確認し、形状などに異常がないことを確認します。
培地を捨て、PBSでリンスし、余分な溶液を取り除きます。

固定

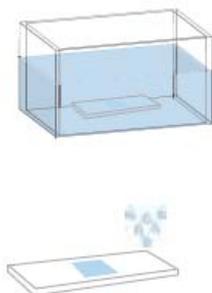
以下の4種類の固定法から最適な固定法を選んで細胞を固定します。適する固定法は抗体や細胞によって異なります。

メタノール・アセトン固定



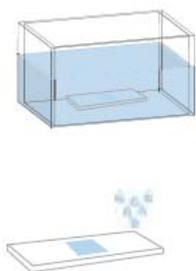
1. あらかじめ-20℃で冷却したメタノール中で-20℃で10分間処理して固定。
2. メタノールを取り除きます。
3. あらかじめ-20℃で冷却したアセトン中で-20℃で1分間透過処理。

パラホルムアルデヒド・トリトン固定



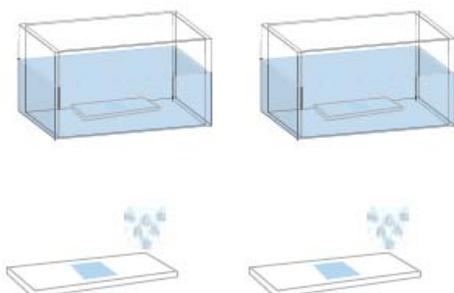
1. 3~4% パラホルムアルデヒド中で10~20分間固定。
2. PBSで軽くリンスします。
3. 0.5% Triton X-100で2~10分間透過処理。

パラホルムアルデヒド・メタノール固定



1. 3~4% パラホルムアルデヒド中で10~20分間固定。
2. PBSで軽くリンスします。
3. あらかじめ-20℃で冷却したメタノール中で5~10分間透過処理。

PEM・エタノール固定



1. PEMバッファー中で10分間固定。
2. PBSで2回軽くリンスします。
3. 冷却エタノール中で-20℃で5~10分間透過処理。
4. PBSで3回洗浄 (1回あたり5分以上)。

抗体の実験にきっと役立つ基礎知識

一次抗体反応



1. 一次抗体をPBSで希釈し、適切な希釈倍率にします。希釈した一次抗体をサンプルの細胞に滴下し、室温で60分間インキュベートします。サンプルの表面が乾いて露出しないよう、加湿チャンバー内のインキュベートが推奨されます。
2. PBSで3回洗浄（5分以上）。

一次抗体の希釈率の検討は特に重要じゃな



二次抗体反応



二次抗体反応は間接法（未標識の一次抗体と蛍光標識された二次抗体を用いる場合）に行います。

1. 標識二次抗体をPBSで希釈し、適切な希釈倍率にします。希釈した二次抗体をサンプルに滴下し、室温で30分間インキュベートします。サンプルの表面が乾いて露出しないよう、加湿チャンバー内のインキュベートが推奨されます。
2. PBSで3回洗浄（5分以上）。
3. PBSをよく取り除きます。

観察

1. スライドガラス上に細胞が接着している場合は、マウント剤（封入剤）を滴下してカバーガラスをかぶせます。カバーガラス上に細胞が接着している場合は、カバーガラスの細胞面にマウント剤（封入剤）を滴下し、反転させてスライドガラス上に置きます。
2. 顕微鏡下で観察します。

コントロールについて

検出結果が適切かどうか確認するため、適切なネガティブコントロールで並行して行うことが推奨されます。ネガティブコントロールでバックグラウンドの蛍光および一次抗体・二次抗体の非特異的染色が確認されます。

理想的なネガティブコントロールとしては、蛍光色素標識マウスモノクローナル抗体または骨髄腫タンパク質です。研究対象の動物種の細胞に特異的ではなくとも、アイソタイプが一致したもので、試験抗体と同じ濃度にするのが推奨されます。

自己蛍光性又はネガティブコントロール試薬の蛍光の程度は、研究対象の細胞種及び使用機器の感度によって異なります。Fc受容体を有する細胞の蛍光解析の場合、アイソタイプが一致したネガティブコントロールを必ず使用して下さい。

マウント剤でカバーガラスをマウントし、スライドガラス上に反転させる。

顕微鏡下で観察し撮像する。

抗体の実験にきっと役立つ基礎知識

免疫蛍光染色 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、細胞または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。
	抗体が至適濃度でない	希釈倍率を検討して、蛍光標識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、使用する抗体量を多くしてお試し下さい。
	蛍光顕微鏡用のフィルターが適切でない	蛍光色素標識の可視化に適したフィルターを用いて下さい。
	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。
	蛍光標識が消失または退色している	染色の各ステップでサンプルを暗所あるいはカバーしてインキュベートして下さい。n-プロピル没食子酸塩 (製品番号P3130)やp-フェニレンジアミン (製品番号P1519)、DABCO(製品番号D2522) など、マウント液中に抗退色試薬を使用することをご検討下さい。
	培養細胞の場合、細胞内に発現しているタンパク質/抗原と抗体分子が接触しない	細胞を透過化処理する必要があります。細胞の固定は、-20℃のメタノール中に10分間、続いて-20℃アセトン中で1分間で行ってみて下さい。あるいはその代わりに、0.5% Triton X-100を含む3%パラホルムアルデヒドで室温で10分間インキュベートして試して下さい。
	ホルマリン固定 パラフィン包埋切片の場合、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ない	プロテアーゼによる露出処理、または凍結切片の染色をご検討下さい。通常使われるプロテアーゼは、0.4%ペプシン(製品番号P7012)の0.01N HCl溶液、0.1%プロテアーゼ(製品番号 P4789)のPBS溶液、あるいは10mM CaCl ₂ を含む0.1%トリプシン(製品番号T8003)水溶液です。至適条件は経験的に決定されます。
バックグラウンドが高い	凝集している	抗体をマイクロ遠心機で最高速にして短時間遠心し、凝集した抗体を除去して下さい。
	抗体が細胞表面のFcレセプターに結合する	サンプルを10%の関連しない血清(例えばヤギ血清 製品番号G9023)とインキュベートし、標識抗体をアプライする前にFcレセプターを占有します。F(ab') ₂ 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。
	抗体が至適濃度でない	希釈倍率を検討して、蛍光標識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。
	固定液により組織中に残存したアルデヒド(ホルムアルデヒド、特にグルタルアルデヒド)が、アミノ基を介して、使用する免疫試薬の共有結合部位となっている	血清のみで十分ブロックされない場合、次のうち一つ以上をお試し下さい。 (a) 0.02~1%水素化ホウ素ナトリウムまたはカリウム溶液 (0.1Mリン酸緩衝液 pH7.4) で、室温で30分間。 (b) 50~100mM塩化アンモニウムをブロッキング用血清に添加。 (c) 100mMEタノールアミンをブロッキング用血清に添加。 (d) 0.2MグリシンのPBS溶液で5分間。
サンプル組織・細胞の自家蛍光(自己蛍光)	グルタルアルデヒドが組織中の自家蛍光を誘導し、組織への抗体の浸透を減少させている ⁷	アルデヒド固定は避けて下さい。 アセトン固定の凍結切片をご検討下さい。
	通常、組織の自家蛍光は蛍光フィルターを使用したときに緑黄色であるが、ローダミンフィルターを使用しても観察される	Pontamine Sky Blue (Chicago Sky Blue 6B) を含むPBS溶液は、蛍光フィルターの使用で赤色蛍光を発します。組織切片を遮蔽試薬で30分間染色した後、一次抗体をアプライします。

2015年5月