

## 3-2-2 細胞内のタンパク質の発現を観る（免疫染色法）

### 概要

免疫染色法は特異抗体により各種試料中のタンパク質や糖質分子などを検出する技術である。試料を特異抗体と適当な時間、結合反応させ、洗浄した後に二次抗体と結合反応させる。二次抗体は一次抗体（最初に反応させた特異抗体のこと）を作製した動物種ごとの不変領域ペプチド部分に特異的に結合するものが市販されており、検出に適した標識がなされている。例えば、フルオレッセインやローダミンなどの蛍光色素や、アルカリホスファターゼなどの酵素が二次抗体に共有結合させられている。蛍光二次抗体を用いる場合は、試料を洗浄後、直接蛍光顕微鏡で観察する。酵素標識抗体を用いる場合は、試料を洗浄後、さらに酵素の基質中で反応させ、生成した色素を沈着させた後に、透過光で観察する。

適当なアジュバンドとともに動物を免疫することにより、ほとんどどのようなタンパク質や糖質分子に対してもこれを抗原とする特異抗体を作製することができることから、医学・生物学の分野で広く用いられている手法であり、古くから病理学や発生生物学などで用いられてきた。現在、ヒトやマウスを含め様々な動物や植物のゲノム情報が明らかにされ、個々の遺伝子がどこでどのように機能しているのかが世界中で活発に調べられている。免疫染色法はそのどこかを明らかにする上で非常に重要なツールとなっている。

免疫染色法のうち、細胞免疫染色は培養細胞などに適用されるもので、細胞内におけるタンパク質や化学物質の局在を見る方法である。これに対し組織免疫染色は組織ないし個体の切片に適用され、組織レベルの局在を見る方法であり、組織構造を同時に観察することで、形態とそれらの機能の関連を解明する手段にもなる。今日、遺伝子改変マウスが幅広く用いられているが、これらのマウスの表現型を組織レベルで解析することが、生体内での機能を理解するうえで非常に重要であることは言うまでもない。またホルマウント免疫染色は胚胎あるいは小動物の成体そのもの丸ごとに適用されるもので、三次元的な情報を一気に得ることができる。この章では学習院大学理学部で使用されている各種免疫染色法のうち、**(A)** 組織免疫染色（花岡研）、**(B)** ホルマウント免疫染色（岡本研）を取り上げて解説する。

### **(A) 組織免疫染色**

#### 1. はじめに

免疫組織化学では、切片化した組織に対して抗原抗体反応を利用し、目的の物質の組織における局在を調べる。組織の切片化には、組織をパラフィンに包埋するパラフィン切片と凍結させる凍結切片があり、表1にパラフィン切片と凍結切片の特徴を示している。凍結切片は、

執筆者 生命科学科 教授 花岡文雄 ([fumio.hanaoka@gakushuin.ac.jp](mailto:fumio.hanaoka@gakushuin.ac.jp))  
生命科学科 助教 横井雅幸 ([masayuki.yokoi@gakushuin.ac.jp](mailto:masayuki.yokoi@gakushuin.ac.jp))  
生命分子研究所 客員所員 櫻井靖高 ([0824k004@gakushuin.ac.jp](mailto:0824k004@gakushuin.ac.jp))  
生命科学科 教授 岡本治正 ([harumasa.okamoto@gakushuin.ac.jp](mailto:harumasa.okamoto@gakushuin.ac.jp))  
生命科学科 助教 本郷育子 ([ikuko.hongo@gakushuin.ac.jp](mailto:ikuko.hongo@gakushuin.ac.jp))

抗原性の保持に優れているが、マウス組織に対してマウスのモノクローナル抗体を用いると、2次抗体の非特異的結合によるバックグラウンドが強く見られる。しかし、パラフィン切片では、パラフィン切片作製の過程で内在性の免疫グロブリンの反応性が減少し、目的の抗原の抗原性が強調されるという特徴がある。当研究室では、マウス組織に対して免疫組織染色を行っているため、主にパラフィン切片を利用している。また、パラフィン切片は一般免疫組織化学に用いられていることから、本稿では、パラフィン切片に焦点を当てて述べる。以下、パラフィン切片の作製技術から免疫組織化学の技法と必要とされる試薬・器具の紹介を併せて行う。

表1 パラフィン切片と凍結切片の比較[1、2]

	パラフィン切片	凍結切片
抗原性	△	◎
操作時間	長時間	比較的短時間
長期保存性	○	△
形態保持	◎	△
有機溶媒	使用	不使用
脂質の保持	×	○

## 2. パラフィン切片作製に必要な試薬・器具・機械

### 2. 1 器具・機械

- ミクロトーム

ティシューテックフェザートラストーム（サクラファインテック：TTM-200-NO）  
替刃は、フェザー社製の A35 を用いている。

- 全自動包埋装置

ティシューテック VIP ジュニア（サクラファインテック：VIP-5-Jr-10）

- 包埋センター

ティシューテック TEC プラスシステム（サクラファインテック：TEC-P-S）

- パラフィン伸展器

サクラ湯浴式パラフィン伸展器（サクラファインテック：PS-110WH）

ティシューテックパラフィン伸展器（サクラファインテック：PS-53）

- 標本ブロック加湿器（サクラファインテック：SMB-1）

- パラフィン溶融機（サクラファインテック：PM-401-II）

- 包埋皿（サクラファインテックで販売されている。組織の大きさに合ったものを使う）

- 包埋カセット（包埋皿と同様）
- スライドグラス

剥離防止処理したものをを用いるのが望ましい。様々な剥離防止処理スライドグラスが売られているが、我々が使用しているのは、MAS コートしたスライドグラス（松浪：S9441）である。

- メス刃
- 外科用ハサミ

## 2. 2 試薬

- リン酸緩衝生理食塩水（PBS）（pH 7. 2）

10 L 作成する場合

リン酸二水素ナトリウム・二水和物（Wako：192-02815）	2. 25 g
リン酸水素二ナトリウム・十二水和物（Wako：196-02835）	16. 15 g
塩化ナトリウム（Wako：191-01665）	40 g

以上の試薬を超純水に溶かし、10 L にメスアップする。染色には、大量の PBS が必要となるので、ポリタンク等に作製するとよい。

- 10% 中性緩衝ホルマリン（Wako：062-01161）＊医薬用外劇物指定
- パラホルムアルデヒド（PFA）（ナカライテスク：26126-54）＊医薬用外劇物指定

粉末の PFA をリン酸緩衝液中で加熱（50～65℃）しながら溶解する。10 N 水酸化ナトリウム溶液を数滴加えることで溶解性を増す。冷却後 pH を調整し、フィルター濾過し残渣を取り除くことでほぼ純粋なホルムアルデヒド溶液となる。ホルムアルデヒドガスが加熱により生じるので、気密性の高い容器を用いて、ドラフト内で行う。4℃ で 1 週間程度保存可能だが、自然酸化により蟻酸を発生するため、用時調製が望ましい。

- エタノール（Wako：052-00467）
- キシレン（Wako：241-00091）
- パラフィン

ティシューテックパラフィンワックス II60（サクラファインテック：7810）

## 3. パラフィン切片の作製方法

### 3. 1 組織の切り出し

組織の切り出しは、メス刃や外科用のハサミなどを用いて行う。組織を座滅しないように、刃を引きながら切るとよい。組織片の大きさは、固定やその他の作業の時間に影響するため、数 mm 程度にする。

### 3. 2 組織の固定

時間の経過とともに、組織が崩壊するだけでなく、目的とする抗原が流出する恐れがあるため、組織の固定は、可能な限り迅速に行う。固定不良やムラを防ぐために、固定する組織に

対して十分量の固定液を用意する。また、ゆっくり振とうしながら行うとより均等に固定ができる。組成様々な固定液があるが、目的とする抗原に適したものに至適化する必要がある。以下に、主に用いている固定液を紹介する。

● 10% 中性緩衝ホルマリン

最も広く用いられている固定液である。固定は室温で行う。ホルムアルデヒドを 37% 含むホルマリン原液を希釈し、リン酸緩衝液で pH を中性に調節したものである。ホルムアルデヒドを含む固定液は、アルコールやアセトンなどの有機溶媒による固定に比べて組織への浸透性が悪く、固定に時間を要する。固定時間は、室温で 3 日間行っている。室温保存が可能である。酸化防止のためにメタノールを含んでいるものがある。ホルマリンは、医薬用外劇物指定されているため、所定の手続きと管理が必要である。

● 4% PFA

ホルマリンよりも組織化学の固定液としては優れていると言われているが、作製に手間がかかるほか、危険性・安定性の観点から敬遠されがちである。例として、4°C で 3 日間振とうしながら行っている。

### 3. 3 組織の洗浄・脱水・透徹

固定後の組織を純水でよく洗浄した後、組織内にパラフィンを均一に浸透させるために、脱水・透徹の作業を行う。脱水はエタノールを用いて段階的に行い、透徹はキシレンで行うのが一般的である。透徹後、パラフィンを組織内に浸透させる。この操作もキシレンと混合したものを用いて段階的に行うと良い。パラフィンの浸透時間は一晩程度要する。各処理に要する時間は、組織の大きさに依存する。手動で行う場合は、[1]や[2]を参考に行って欲しい。一連の操作を自動化する VIP という機械が販売されており、加熱・加減圧・攪拌機能により、より均一にパラフィンを浸透させることが出来、再現良く実験を行うことが出来る。VIP の機械を使用する場合は、組織片を包埋カセットに入れる。以下に、当研究室で用いているプログラム例を紹介する。

表 1 VIP 装置のプログラム例

槽	薬液	濃度	処理時間	設定温度	加圧・減圧	攪拌
1	エタノール	100%	1:30	37°C	on	slow
2	エタノール	100%	1:30	37°C	on	slow
3	エタノール	100%	1:30	37°C	on	slow
4	エタノール	100%	1:30	37°C	on	slow
5	エタノール	100%	2:00	37°C	on	slow
6	エタノール	100%	2:00	37°C	on	slow
7	エタノール	100%	3:00	37°C	on	slow
8	キシレン	100%	0:30	37°C	on	slow

9	キシレン	100%	0:30	37°C	on	slow
10	キシレン	100%	0:30	37°C	on	slow
11	パラフィン		0:30	60°C	on	slow
12	パラフィン		0:30	60°C	on	slow
13	パラフィン		0:30	60°C	on	slow
14	パラフィン		0:30	60°C	on	slow

### 3. 4 パラフィン包埋

包埋皿にパラフィン溶液を適量注ぎ込み、その中にパラフィンに馴染んだ組織をピンセットで摘んで入れる。包埋皿を冷却しながら組織の位置や向きを固定する。固定後、包埋カセットを載せ、パラフィンがカセットに浸る程度注ぎ、冷却器でパラフィンを完全に固める。パラフィンが完全に固まると、包埋皿からパラフィブロックが容易に外れる。ブロックは再融解可能である。ピンセットにパラフィンが付着し、操作が困難な場合は、アルコールランプやガスバーナーで熱して溶解すると良い。但し、加熱したピンセットは、組織に触れる前に、60°C程度のパラフィン溶液に浸けて冷ましてから用いる。

### 3. 5 切片の作製

マイクロトームを用いて薄切を行う。マイクロトームの刃は、様々なものが販売されているが、組織の特性に応じて選ぶ。主に用いているのはフェザー社の A35 である。薄切を行う際、目的の組織が出てくるまで、まず面出しを行う。面出しを行うときは、数 10  $\mu\text{m}$  の厚みで良い。面出しを行っている際、マイクロトームの刃がパラフィブロックに平行に当たるように調節する。面出しでは荒削りするため、少なからず刃に傷が付いており、綺麗な薄切が困難なため、面出しと薄切する刃は分けておくことをお勧めする。組織切片の厚みは、組織の種類に依存するが、一般的に数 $\mu\text{m}$ 程度（当研究室は主に 3  $\mu\text{m}$ ）が望ましい。薄いと発色や蛍光が、シャープに得られるが、再現性や連続切片が難しい。厚いと抗原物質がその分多く含まれるため、発色や蛍光は強く得られるが、バックグラウンドも強くなる。薄切するとき、蒸気が見えるか見えない程度の加湿をしたほうが薄切し易い。薄切した切片は水を含ませた刷毛などを用いて回収する。複数枚切片が必要な場合は、純水で満たした容器に浮かべておく。リズム良く一定の動作を行うことが、良質な切片を得るには非常に重要である。切片をスライドグラスですくい上げ、52°Cの水浴で切片を伸展させる。十分伸展させたら、再度スライドグラスですくい上げ、余分な水分をキムタオルで除いた後、42°Cのパラフィン伸展器上で乾燥させる。乾燥は、組織を剥離させないために非常に重要な操作なので、一晩じっくり行う。

### 3. 6 脱パラフィン処理

抗原抗体反応を起こすためには、パラフィンを取り除く必要がある。キシレンの入った染色瓶に4回各5分間浸漬することで、完全にパラフィンを溶解する。次に、100%エタノールに4回各5分間浸漬し、その後、純水で3回各5分間洗浄し、水和させる。エタノールに浸漬

した際、白濁した場合は、脱パラフィンが不十分である。また、純水で洗浄後、スライドガラスの撥水性を見てみると良い。撥水性が高い場合、水和が不十分である。脱パラフィン操作が不十分な場合、やり直してもその後の操作に差し支えない。

## 4. 組織免疫染色に必要な試薬・器具

### 4. 1 器具

- 染色バスケット
- 染色瓶
- タッパーウェア（電子レンジ使用可能なもの）
- 電子レンジ
- 湿潤箱（コスモバイオ 多目的インキュベーションチャンバー）

抗体や血清、その他貴重なものや高価なものを用いる反応は、湿潤箱を用いて行う。使用方法は、湿潤箱の底面に純水を張り、反応液の乾燥を防ぐ。染色瓶から取り出したスライドガラスの余分な水分を、折りたたんだキムワイプなどで可能な限り取り除く。これは、反応液が過度に希釈されるのを防ぐためである。滴下する反応液は、200  $\mu$ l 以上あれば十分である。水分をふき取る面積を一定にしておくこと、再現性良く実験を行うことが出来る。

- カバーガラス（松浪）

### 4. 2 試薬

[全てにおいて必要な試薬]

※は VECTASTAIN ABC キットに含まれているものを示している。

- PBS (2. 2 参照)
- 50 mM トリス緩衝生理食塩水 (TBS) (pH 7. 6)

10 L 作製する場合

トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン（ナカライテスク：33434-21） 13. 9  
g

トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン塩酸塩（ナカライテスク：35433-15） 60. 6  
g

塩化ナトリウム 87. 7  
g

以上のものを超純水に溶解し、10 L にメスアップする。

- 過酸化水素水（Wako：081-04215）\* 医薬用外劇物指定
- 10 mM クエン酸緩衝液 (pH 6. 0)

クエン酸・一水和物（Wako：031-03492）4. 20 g を 200 ml の超純水に溶解した 0. 1 M クエン酸一水和物溶液 18 ml とクエン酸三ナトリウム・二水和物（Wako：191-01785）5. 88 g を 200 ml の超純水に溶解したクエン酸三ナトリウム・二水和物溶液 82 ml を超純水 900 ml に加

える。

- 0.05%トリプシン溶液

トリプシン (Wako:203-11302) 100 mg と塩化カルシウム・二水和物 200 mg (Wako:031-00435) を 10 mM Tris-HCl (pH 7.6) 200 ml に溶解する。緩衝液に PBS を用いても良いが、塩化カルシウムを除く必要がある。

- 水酸化ナトリウム (NaOH) 溶液 (Wako : 198-13765)
- RNase A (Roche : 10109169001)
- ブロッキング試薬※

Normal horse serum (Vector : S-2000)

- 1次抗体

免疫組織化学において最も重要なのは、特異性の高い抗体を選ぶことである。抗体が、免疫組織染色に使用可能か、論文などで実績があるかなどを事前に調べる。

- ビオチン標識 2次抗体※

Biotinylated anti-mouse IgG (H+L) (Vector : BA-2000)

[酵素抗体法に必要な試薬]

- ABC 試薬※

アビジン DH とビオチン標識西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP)

- ジアミノベンジジン (DAB) (同仁化学 : 347-00904)
- ヘマトキシリン

様々な組成のヘマトキシリンが販売されているが、我々が使用しているのは、マイヤー・ヘマトキシリン (武藤化学 : 3001) である。

- マリノール (武藤化学 : 2040) \*危険物指定
- 光学顕微鏡

[蛍光抗体法に必要な試薬]

- 蛍光標識したストレプトアビジン

Streptavidine Alexa Fluor 594 (Invitrogen : S-32356)

- ヘキスト 33342 (同仁化学 : 346-07951)
- ProLong Gold antifade reagent (Invitrogen : P36930)
- マニキュア

無色透明のものをドラッグストアで購入。粘性が高いと凹凸が出来やすいため、アセトンで希釈して用いている。

- 蛍光顕微鏡

組織には厚みがあるため、共焦点レーザー顕微鏡が望ましい。

## 5. 組織免疫染色法

組織免疫染色の方法には、1次抗体を直接修飾し、抗原抗体反応を1度しか行わない直接法と2次抗体あるいは3次抗体を修飾し、複数回の抗原抗体反応を行う間接法がある。パラフィン切片は抗原性が低いため、間接法が主に用いられる。間接法では、抗体の非特異的な結合により、バックグラウンドや人工産物が観察されることがあるため、1次抗体を加えないものを用意し、2次抗体の非特異的結合によるものではないことを調べておくことを勧める。また、免疫染色の可視化の方法に、化学発色を利用する方法（酵素抗体法）と蛍光色素を利用する方法（蛍光抗体法）がある。両者の特徴を表2に示している。

表2 酵素抗体法と蛍光抗体法の比較[1]

	酵素抗体法	蛍光抗体法
視野	明視野	暗視野
形態把握	○	△
長期保存性	◎	×
多重染色	△	○
定量性	△	○
観察方法	光学顕微鏡	蛍光顕微鏡

組織全体における抗原物質の局在を観察するためには、酵素抗体法が優れているが、多重染色や定量を行う場合には、蛍光抗体法が適している。実験の目的に応じてどちらの手法を選ぶかを熟考して欲しい。以下に、当研究室で実際に行っている実験方法を紹介する。また、各実験操作の間は、PBS洗浄を行う。PBSを注いだ染色瓶に染色カゴに入れたスライドグラスを5分間浸漬する。この操作を毎回新しいPBSを用いて3回行う。

## 5. 1 酵素抗体法

高感度に抗原物質を検出するために、様々なキットが開発されている。ここでは、アビジン・ビオチン複合体を利用したABC法による増感法を用いて染色した方法を述べる。実験手順は、主にVector社のVECTASTAIN ABCキット[3]に準じる。染色後、組織構造を観察する際は、[4]を参考にして欲しい。

### 5. 1. 1 内在性ペルオキシダーゼ (POD) 活性の阻止

抗体に標識する酵素がPODの場合、内在性PODの活性が強いバックグラウンドとなる。これを阻止するために、 $H_2O_2$ を用いて、PODを不活性化させる。超純水で希釈した3%  $H_2O_2$ を用いて室温で5分間処理を行っている。メタノールで希釈した0.3%  $H_2O_2$ を用いる方法もある。

### 5. 1. 2 抗原性の賦活化



固定処理や有機溶媒処理、パラフィン包埋などの過程で多かれ少なかれ抗原性が損なわれる。主に、固定処理により抗原がマスクングされてしまうことが考えられる。そのため、熱処理やタンパク分解処理、界面活性剤処理を行い、失われた抗原性を賦活化させることが必要となる。

- マイクロウェーブによる加熱

10 mM クエン酸バッファー (pH 6.0) に染色バスケットごと浸漬し、電子レンジで加熱を行う。沸騰させると組織切片がスライドガラスから剥離する恐れがあるので、沸騰させないように行う。沸騰しかけたら、電子レンジから取り出し、放冷する。加熱と放冷を繰り返し、賦活化を行う。当研究室では、750 ml のバッファーをタッパウェアに入れ、700 W で合計 10 分加熱処理を行っている。クエン酸バッファーの他にも 1 あるいは 10 mM EDTA 溶液を用いることもある。電子レンジの代わりに、オートクレーブを用いる方法もある。

- タンパク質分解処理

タンパク質分解処理は、抗原性を賦活化させる反面、組織切片を消化しすぎる場合があるので、タンパク質分解酵素の種類や濃度、処理時間・温度を厳密に調整する必要がある。例として、0.05% トリプシン溶液の場合、室温で 5 分間反応させている。

- DNA の変性

DNA 損傷を認識する抗体の殆どは、一本鎖のものにしか反応しない。そのため、二本鎖の DNA を変性し、一本鎖にする必要がある。10 N の NaOH を 70% EtOH で 70 mM に希釈したものを用いている。室温で 5 分間反応させると十分な結果が得られている。

### 5. 1. 3 ブロッキング

抗原抗体反応を利用した実験では、非特異的な抗体の結合を阻止するために、ブロッキング処理を行う必要がある。

- RNA の分解

DNA 損傷を検出する場合、RNA の混入がバックグラウンドとなる場合がある。予め組織中の RNA を分解しておくために、250 µg/ml の RNase A 溶液を用いて、37°C で 30 分反応させる。

- 抗体の非特異的結合の阻止

ブロッキングには、血清やスキムミルク、ゼラチンなどを用いて行うことが多い。血清を用いる場合、2 次抗体を産生した動物の正常血清を用いることで、2 次抗体によるバックグラウンドも抑えられる。ブロッキング溶液の濃度や処理時間・温度はよく検討する。例として、PBS で希釈した 3% ウマ正常血清を用いて、15 分間室温で行う。

### 5. 1. 4 1 次抗体反応

1 次抗体をブロッキング溶液で希釈して行う。希釈倍率は検討する必要があるが、ウェスタンブロットに用いている抗体の場合は、その希釈倍率の 2~5 倍の濃さで行うのが望ましい。反応時間は、4°C の場合は一晩、室温の場合は 2 時間行う。

### 5. 1. 5 2次抗体反応

ビオチン化した抗体をブロッキング溶液で希釈して行う。抗体の希釈倍率や反応時間・温度は十分検討する。例えば、希釈倍率 1/200 で、室温で 30 分間行う。室温やそれ以上の温度で反応を行う場合は、予め湿潤箱をインキュベートしておいたほうが良い。

### 5. 1. 6 3次抗体反応

100  $\mu$ l のアビジン DH を 5 ml の PBS に加え、さらに 100  $\mu$ l のビオチン標識 HRP を加え ABC の形成を行う。ABC 試薬の準備は、3 次抗体反応の 30 分前に行う。ABC 試薬を滴下後、室温で 30 分反応させる。

### 5. 1. 7 化学発色反応

50 mM TBS (pH 7. 6) 150 ml に 30 ~ 40 mg の DAB を溶解し、使用直前に 150  $\mu$ l の 30% $H_2O_2$  を加える。DAB 溶液に数十秒から数分浸漬し、発色させる。DAB の反応産物は褐色である。顕鏡の際、反応が進まないように、別の染色瓶に用意した TBS に浸漬しておく。発色後、1 分程度流水で反応液を洗い流す。発色時間が長時間に及ぶ場合、 $H_2O_2$  を追加することもある。DAB は発癌性があると言われているので、取り扱いには十分注意する。吸引しないようにマスクを着用し、手袋を装着する。

### 5. 1. 8 対比染色

組織構造を識別しやすいようにするために、対比染色を行うと良い。ヘマトキシリンやチルグリーンなどが一般的である。ヘマトキシリン染色は、ヘマトキシリン溶液に数分浸漬し、余分な色素を流水で洗い流すだけである。染色時間は、処理の異なる切片ごとに異なるので、流水洗浄中に顕鏡し、染色が不十分な場合は再度染色する。染色しすぎた場合は、流水洗浄を入念に行うことで多少解消される。あくまで目的のシグナルにコントラストを加える意味合いなので、過度に染色しない。組織構造を見たい場合は、ヘマトキシリン・エオシン (HE) 染色を別に行うと良い。

### 5. 1. 9 脱水・透徹・封入

免疫染色した組織切片を長期保存するために、脱水・透徹し、その後封入作業を行う。脱水・透徹のステップは、脱パラフィン処理の逆を行えばよい。エタノールで脱水を行い、キシレンで透徹を行う。透徹後、カバーグラスに封入剤を滴下し、カバーグラスを切片に被せる形で封入を行う。カバーグラスを斜めにし、端から徐々に被せることで空気の混入を防ぐことが出来る。気泡が入った場合、ピンセット等で押すことで除去することが可能であるが、気泡が多い場合は、キシレン溶液に浸漬し、封入剤を溶解することで、再封入できる。封入したスライドグラスは平らな場所で十分乾燥させる。キシレンは、揮発性が高く、切片が乾燥してしまうため、封入作業は 1 枚ずつ行う。

## 5. 2 蛍光抗体法

蛍光抗体法の利点は、前にも述べたように多重染色が容易なことと定量性が高いことである。2 次抗体反応までのステップは、酵素抗体法と同様に行っている。

### 5. 2. 1 3次抗体反応

蛍光標識したストレプトアビジンをブロッキング溶液で希釈して行う。希釈倍率や反応条件はよく検討する。例えば、Alexa Fluor 594 で標識したストレプトアビジン溶液で室温 30 分を行っている。言うまでもなく、反応は暗室で行うなど蛍光の退色防止に気をつける。

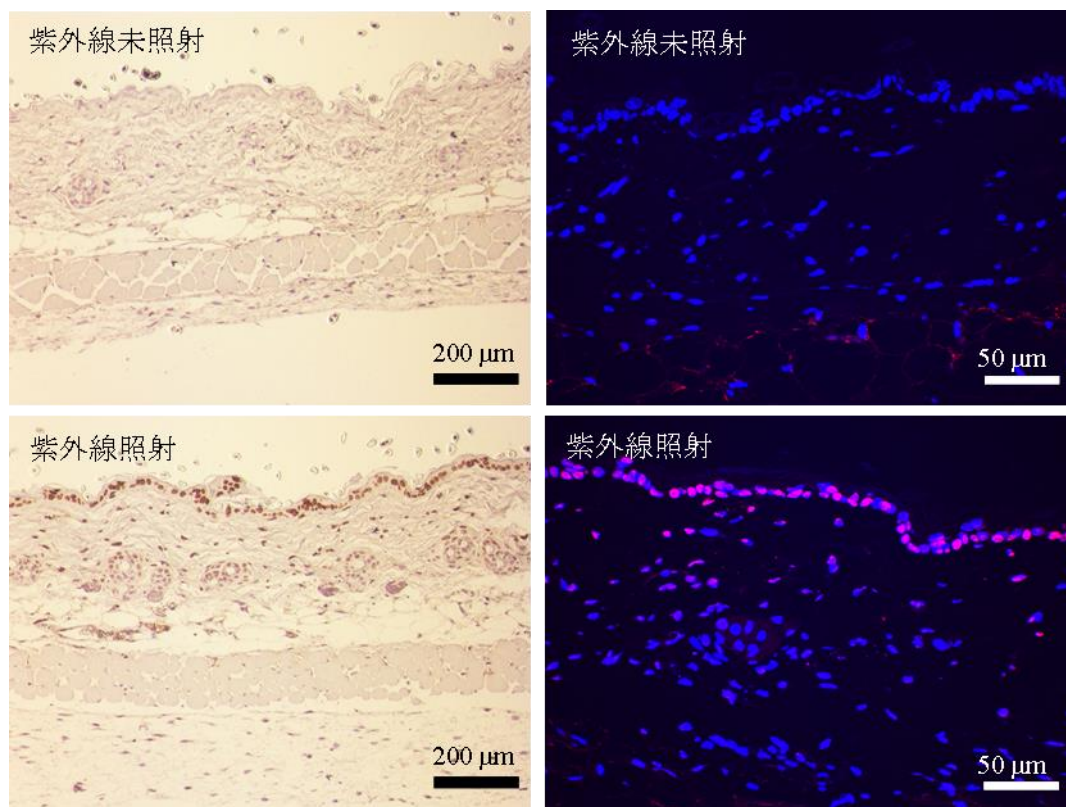
### 5. 2. 2 核染色

酵素抗体法の対比染色に当たる意味合いで、核染色を行う。核染色で用いられる蛍光は、ヘキストと DAPI が青、PI が赤である。例として、10  $\mu\text{g/ml}$  ヘキスト 33342 を用いて、室温で 30 分間反応させる。

### 5. 2. 3 封入

蛍光の退色防止剤を滴下し、カバーガラスを被せ、封入を行う。固化しない退色防止剤の場合、乾燥を防止するために、カバーガラスの縁をマニキュアでシールすると良い。

図 1 紫外線損傷によるマウス皮膚に生じる DNA 損傷を染色した例



酵素抗体法

褐色 : DNA 損傷

薄紫 : 核

蛍光抗体法

赤色 : DNA 損傷

青色 : 核

ピンク色に見えるのは、核に DNA 損傷が存在するためである。

主に表皮に紫外線による DNA 損傷が観察される。

## 参考文献

- [1] 改訂四版 渡辺・中根 酵素抗体法 名倉宏、長村義之、堤寛 編集 学際企画 (2002)
- [2] 実験医学別冊 注目のバイオ実験シリーズ 免疫染色&*in situ* ハイブリダイゼーション 最新プロトコール 野地澄晴 編集 羊土社 (2006)
- [3] VECTASTAIN ABC システム 実験マニュアル (第 6 版) Vector 社 (2008)
- [4] マウス組織学 多田伸彦 学際企画 (2004)

## (B) ホールマウント免疫染色 (アフリカツメガエルの胚を試料として)

### 1. はじめに

試料が十分小さく透明であるか、あるいは漂白などの操作により透明化できるものであれば、免疫染色はホールマウントで (試料全体を用いて) 行うことができる。この手法は、切片化などの操作が必要ないので比較的迅速であり、試料の中での抗原の局在部位について三次元的な情報を一挙に得ることができる。ここではアフリカツメガエルの胚を試料として解説する。

### 2. 実験手順 (3-2-3 (A) 「ホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーション」の項と重複する部分も多いが、便宜上、重複部分の省略はしない)

滅菌済の器具を使用する。プロトコールに温度の指定がない場合は室温で行う。

#### ① 胚の固定

下記の液量は目安。胚の数に応じて液量、シャーレの大きさを変える。

胚を移すときは、パスツールピペットの先を切って吸い口を広げ、滅菌したものを用いる。

- 1) 1/2×MBS 3ml を入れた直径 35mm シャーレ (Falcon 3001) に胚を移す。(液量 3ml に対し、上限 100 ケ)
- 2) シャーレを手前に傾け、胚が被る位の液を残して 1/2×MBS を取り除き、MEMFA 3ml を入れ、5 分置く。
- 3) MEMFA 3ml を入れ換える。2 時間、ゆっくりと振盪させながら固定。
- 4) 1×MEM 3ml に置き換える、5 分。
- 5) エタノール 3ml に置き換える、5 分×2。
- 6) エタノール 3ml に置き換える。スクリュウキャップ付ガラスバイアルにエタノールを入れ、胚を移し -20°C 保存。

#### ② 水和

- 1) エタノール (500  $\mu$  l/1 穴) を入れた 24 穴プレートを用意し、固定した胚 (固定後、-20°C でエタノール中に一晚以上置いた胚 1-10 ケ/1 穴) を移す。

2) エタノール除き, メタノール (500  $\mu$  l/1 穴) を入れる。

下記の順に溶液を置き換える。ゆっくり振盪。

1. メタノール (500  $\mu$  l/1 穴) 5分 $\times$ 2
2. 75% メタノール・25% PBST (650  $\mu$  l/1 穴) 5分
3. 50% メタノール・50% PBST (650  $\mu$  l/1 穴) 5分
4. 25% メタノール・75% PBST (650  $\mu$  l/1 穴) 5分
5. PBST (650  $\mu$  l/1 穴) 5分 $\times$ 2

### ③ 漂白とビテリン膜除去

- 1) PBST を除き、漂白液 (650  $\mu$  l/1 穴) を入れて 4°C で 12-14 時間静置 (染色で得られるシグナルが弱いケースも多いので予備実験ではとりあえず真っ白にする)。
- 2) PBST (650  $\mu$  l/1 穴) に置き換えてゆっくりと振盪させながら洗浄、5分 $\times$ 2。
- 3) アフリカツメガエルの胚はビテリン膜で覆われており、これが抗体の胚試料本体への浸透を防げるので、この時点で試料を TE (pH8.0) 溶液中に置き、ビテリン膜を実体顕微鏡下にピンセットなどで取り除いておく。
- 4) MEMFA (650  $\mu$  l/1 穴) で 20 分間固定。ゆっくり振盪。
- 5) 2mg/ml glycine in PBS (650  $\mu$  l/1 穴) に置き換える。5分 $\times$ 2、ゆっくり振盪。
- 6) PBST (650  $\mu$  l/1 穴) に置き換えてゆっくりと振盪させながら洗浄、5分。

### ④ 抗体反応

- 1) 2% blocking reagent in MAB-Triton (650  $\mu$  l/1 穴) に置き換える。1時間ゆっくり振盪。
- 2) 一次抗体を 2% blocking reagent in MAB-Triton で適切に希釈した抗体液 (650  $\mu$  l/1 穴) に置き換える。4-8°C で 0/N、ゆっくり振盪。
- 3) 2% blocking reagent in MAB-Triton (650  $\mu$  l/1 穴) で洗浄。室温で 1時間 $\times$ 2、次いで 4-8°C で 1時間 $\times$ 6、ゆっくり振盪。
- 4) 二次抗体を 2% blocking reagent in MAB-Triton で適切に希釈した抗体液 (650  $\mu$  l/1 穴) に置き換える。4-8°C で 0/N、ゆっくり振盪。
- 5) 2% blocking reagent in MAB-Triton (650  $\mu$  l/1 穴) で洗浄。室温で 1時間 $\times$ 2、次いで PBST (650  $\mu$  l/1 穴) に置き換え、4-8°C で 1時間 $\times$ 6、ゆっくり振盪。

### ⑦ 発色反応

- 1) alkaline phosphatase buffer (使用時, + 最終濃度 2mM levamisol) (650  $\mu$  l/1 穴) に置き換えてゆっくりと振盪させる、30 分間。
- 2) alkaline phosphatase buffer で 9 倍希釈した BM purple (650  $\mu$  l/1 穴) に置き換える。アルミホイルを被せて遮光し、発色させる。
- 3) 十分に発色させた後、PBST (650  $\mu$  l/1 穴) で洗浄する。5分 $\times$ 2、ゆっくり振盪。
- 4) MEMFA  $\cdot$  0.2% glutaraldehyde (650  $\mu$  l/1 穴) に置き換えて、プレート本体と蓋の隙間をビニールテープで塞ぎ 4°C 保存。

- 5) 写真撮影時、MAB に置き換える。写真撮影後、MEMFA・0.2% glutaraldehyde に置き換えて、プレート本体と蓋の隙間をビニールテープで塞ぎ、4℃保存。

### 3. 試薬

免疫染色の試薬は、DEPC 処理水をオートクレーブ滅菌済 MilliQ 水に置き換えて調製できる。

● 【DEPC 処理水 1 l (0.05%)】

- 1) 1 l 試薬瓶に MilliQ 水 1 l(瓶の目盛り使用)と攪拌子を入れる。DEPC (Sigma diethylpirocarbonate、4℃) 500  $\mu$ l を加えて攪拌、放置。攪拌と放置時間を合わせて 2-3 時間。(DEPC は水と混ざりにくいのでしっかりと攪拌する)
- 2) オートクレーブ 121℃、40 分。(DEPC を分解させる)

● 【10×MBS 1 l】

NaCl	51.42g
KCl	0.74g
HEPES	11.92g
NaHCO <sub>3</sub>	2.02g
MgSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O	2.02g
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ・4H <sub>2</sub> O	0.78g
CaCl <sub>2</sub> ・2H <sub>2</sub> O	0.60g

1 l ビーカー(+攪拌子)に MilliQ 水を約 800ml 入れ、上記の試薬を上から順に 1 種類ずつ加えて攪拌しながら溶かす(順序を変えたり、溶けないうちに次の試薬を加えると沈殿を生じることがあるので注意)。pH を 1N NaOH で 7.5 に調整し、室温に戻した gentamicin sulfate (Sigma, 4℃) 200mg を加えて攪拌、溶解。MilliQ 水で 1 l にメスアップ後、ビーカーに戻す。0.22  $\mu$ m フィルター(MILLIPORE STERIVEX-GP 0.22  $\mu$ m Filter Unit with Filling Bell)に通し(50ml 注射筒使用)、750ml 容器(Falcon 3028)2 ヶに分けて入れる。4℃保存。

● 【MEMFA (用時調製) 50ml】

- 1) オートクレーブ滅菌済 50ml メスシリンダー(+攪拌子、固定液調製専用)に DEPC 処理水を約 30ml 入れ、60-65℃の水浴中で攪拌しながら温めておく。
- 2) paraformaldehyde 2g と 1N NaOH 125  $\mu$ l を入れ、約 40ml になるように DEPC 処理水を加える。温めながら攪拌し、完全に溶けたら氷中で冷やす。
- 3) 2) を 50ml チューブに移して DEPC 処理水を 45ml の目盛りまで加える。

10×MEM 5ml を加え混合(使用するまで氷中保存、固定時に調製)。

● 【10×MEM 500ml】

- 1) 500ml ビーカー(+攪拌子)に MilliQ 水を約 450ml 入れ、MOPS 104.7g を加えて攪拌する。  
溶解後 pH7.4 に調整。
- 2) EGTA 3.80g を入れて溶かす (EGTA は pH 調整後に加えると溶けやすい)。
- 3)  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.25g を加えて溶解。
- 4) pH を 7.4 に微調整後、MilliQ 水で 500ml にメスアップ。
- 5) 500ml 試薬瓶に移し、オートクレーブ 121°C、20 分。(オートクレーブ後、徐々に黄色味を帯びるが実験上問題はない)

● 【1×MEM 200ml】

250ml 容器 (Falcon 3024) に 10×MEM 20ml を入れ、DEPC 処理水を容器の 200ml の目盛りまで加えて混合。これを 50ml チューブに decantation で移して使う。

● 【10×PBS 1l】

- 1) 1 l ビーカー(+攪拌子)に MilliQ 水を約 800ml 入れる。

2)	NaCl	80g
	KCl	2.0g
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (無水リン酸一水素 Na)	11.5g
	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ (無水リン酸二水素 K)	2.0g

順に加えて溶解後、HCl で pH7.4 に調整。MilliQ 水で 1l にメスアップ。

- 3) 1 l 試薬瓶に移し、オートクレーブ 121°C、20 分。

● 【PBST (1×PBS・0.1% Tween20) 200ml】

250ml 容器 (Falcon 3024) に 10×PBS 20ml を入れ、DEPC 処理水を容器の 200ml の目盛りまで加える。10% Tween20 2ml を入れて混合。これを 50ml チューブに decantation で移して使う。

● 【10% Tween20 10ml】

15ml チューブに Tween20 (Sigma Tween20) 1ml と DEPC 処理水 9ml を入れて混合。

● 【漂白液(用時調製) 10ml】

- 1) 15ml チューブに、DEPC 処理水を約 6ml 入れる。
- 2) 2×SSC 2.5ml、formamide 500  $\mu$ l、30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  333  $\mu$ l を加えて、DEPC 処理水で 10ml にメスアップ。

● 【20×SSC 1 l】

- 1) 1 l ビーカー(+攪拌子)に MilliQ 水を約 800ml 入れる。

2)	NaCl	175.3g
	$\text{NaOOCCH}_2\text{C}(\text{OH})(\text{COONa})\text{CH}_2\text{COONa} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (クエン酸三 Na 二水和物)	88.2g

を順に加えて溶解後、NaOH で pH7.0 に調整。MilliQ 水で 1 l にメスアップ。

- 3) 1 l 試薬瓶に移し、オートクレーブ 121°C、20 分。

● 【TE(pH8.0) (10mM Tris・Cl, 1mM EDTA) 1 l】

1 l 試薬瓶に MilliQ 水を約 900ml 入れる。1M Tris・Cl (pH8.0) 10ml、0.5M EDTA (pH8.0) 2.0ml を加える。MilliQ 水を 1 l の目盛りまで入れて混合。オートクレーブ 121°C、20 分。

● 【1M Tris・Cl (pH8.0) 1l】

1 l ビーカー(+攪拌子)に MilliQ 水を約 800ml 入れ、Tris base (Sigma Trizma Base) 121.1g を加えて溶かし、HCl で pH8.0 に調整。MilliQ 水で 1 l にメスアップ。1 l 試薬瓶に移し、オートクレーブ 121°C、20 分。

● 【0.5M EDTA (pH8.0) 1l】

1 l ビーカー(+攪拌子)に MilliQ 水を約 800ml 入れ、EDTA・2Na・2H<sub>2</sub>O 186.1g を加えて、攪拌させながら NaOH で pH8.0 に合わせる。pH が 8.0 に近づくと、溶け始める。MilliQ 水で 1 l にメスアップ。1 l 試薬瓶に移し、オートクレーブ 121°C、20 分。

● 【2mg/ml glycine in PBS 1l】

1 l ビーカー (+攪拌子) に DEPC 処理水を約 950ml 入れ、10×PBS 10ml を加えて攪拌し、glycine 2g を入れて溶かす。1l にメスアップ、1l 試薬瓶に移し、オートクレーブ 121°C、20 分。

● 【2% blocking reagent in MAB-Triton 500ml】

blocking reagent (Roche 096176、-20°C) を室温に戻す。500ml 試薬瓶(+攪拌子)に blocking reagent 10g を入れる。MAB を 500ml (瓶の目盛り)まで加えて軽く攪拌。この時点では溶けない。オートクレーブ 121°C、20 分。オートクレーブ滅菌後、攪拌、溶解。4°C 保存。50ml チューブに decantation で移し、用時 10% Triton を最終濃度 0.1% になるよう加えて使用する。4°C 保存。

● 【MAB 500ml】

500ml ビーカー(+攪拌子)に MilliQ 水を約 400ml 入れ、C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>4</sub>(マレイン酸) 5.8g、NaCl 4.3g、NaOH(和光、粒状) 約 3.5g を順に加えて攪拌し、溶かす。10N 及び 1N NaOH で pH7.5 に調整し、MilliQ 水で 500ml にメスアップ。500ml 試薬瓶に移し、オートクレーブ 121°C、20 分。

● 【10% Triton 10ml】

15ml チューブに Triton (Sigma TritonX-100) 1ml と DEPC 処理水 9ml を入れて混合。