

## 細胞の免疫蛍光ラベル

抗体は、抗原の存在と細胞下の局在性を立証するための重要なツールです。細胞染色は非常に用途の広い技術であり、抗原が高度に局在化している場合、1細胞中1,000個程度の抗原分子を検出することができます。また、およその抗原の濃度を決定するために用いられることもあり、その場合は特に、イメージアナライザーで解析します。細胞染色のステップは、細胞の調製、固定、抗体反応および評価の4段階に分かれます。

第1段階として、以降の手順が操作しやすいよう、染色する細胞を固相支持体に接着させます。これには複数の方法があります。附着細胞は、顕微鏡スライド、カバーガラスあるいは光学用のプラスチック支持体上に成長させることができます。懸濁した細胞は、スライドガラス上に置いて遠心分離することができます。化学的なリンカーを用いて固相支持体に結合させる、あるいは懸濁液のままでも操作する場合があります。

第2段階は、抗原と抗体分子が確実に接触するよう、細胞を固定し浸透処理します。完全固定は、抗原を固定化すると同時に、細胞および細胞下の構造を維持し、あらゆる部分に障害なく抗体が接触できる状態にします。数々の固定液が使用されていますが、実験対象となる抗原の性質や使用する抗体の特性によって、適正な方法を選択して下さい。固定の方法は、一般的には有機溶媒と架橋試薬の2つに分類されます。アルコールやアセトンなどの有機溶媒は、脂質を除去し、細胞を脱水すると同時に細胞構造上でタンパク質を沈殿させます。パラホルムアルデヒドのような架橋試薬は、通常、フリーのアミノ基を介して分子間架橋を形成することにより、連結した抗原のネットワークをつくります。架橋試薬は有機溶媒に比べ細胞構造が維持されますが、一部の細胞構成要素は抗原性が低下するため、標本と抗体を接触させるよう透過化処理のステップを追加する必要があります。いずれの固定化法もタンパク質抗原が変性する可能性があるため、細胞染色には変性タンパク質抗原を認識する抗体が有効です。ここでは4種類の固定法を示しますが、関連するアプリケーションに合わせて最適な方法を選択して下さい。

第3段階は、抗体と調製した細胞のインキュベーションです。未結合の抗体は洗浄により除去し、結合した抗体を直接法（一次抗体が標識されている場合）、または蛍光色素標識の二次試薬を用いた間接法で検出します。

第4の最終段階において、蛍光顕微鏡を用いて染色を評価します。

## 試薬および装置

- カバースリップ上に成長させた培養細胞
- PBS : 0.01Mリン酸緩衝生理食塩水、pH7.2~7.4 (シグマ P3813またはP4417)
- a. -20℃で最低1時間冷却したメタノール  
b. -20℃で最低1時間冷却したアセトン  
**または**  
a. 3~4%パラホルムアルデヒド (シグマ P6148) 含有PBS溶液 (5N NaOHを使用し、穏やかに加熱してPBSに溶解)  
b. 0.5%Triton X-100 (シグマ T9284) 含有PBS溶液  
**または**  
a. 3~4%パラホルムアルデヒド (シグマ P6148) 含有PBS溶液 (5N NaOHを使用し、穏やかに加熱してPBSに溶解)  
b. -20℃で最低1時間冷却したメタノール  
**または**  
a. PEM緩衝液 : 0.1M PIPES (シグマ P8203)、5mM EGTA、2mM MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O、NaOH溶液を使用し、pH6.8に合わせます。  
b. -20℃で最低1時間冷却したエタノール
- 一次抗体
- コントロール抗体
- 蛍光色素標識二次抗体
- 水性マウント液
- 顕微鏡用スライドガラス
- 蛍光顕微鏡、検出する蛍光に合ったフィルター
- 倒立顕微鏡 (Nikon TMSなど)

## プロトコール

### 注記

- ここに示しましたプロトコールは概要です。一次抗体および二次抗体の至適希釈率、細胞の調製、コントロール、インキュベートの時間は経験的に決定していただくか、希釈系列を作製して検討していただく必要があります。製品データシートで推奨された一次抗体をご使用いただくことをお勧めします。ネガティブおよびポジティブコントロールについても同様です。
- 化合物の安全操作に関しましては、各製品のMSDSをご参照下さい。
- 固定およびインキュベーションのステップでは、最初の段階を終えた後は室温で反応を行ってください。
- 蛍光標識体や標識されたスライドは遮光して下さい。また、暗所できならずカバーしてインキュベートしてください。

## 細胞の調製

- 細胞をインキュベーターから出して、倒立顕微鏡で観察して細胞の様子を確認し、培地を捨てます。
- PBSでリンスし、余分な液を除去します。

## 固定

- 細胞の固定  
以下に示した4種類の固定方法から、関連するアプリケーション（あるいは製品データシートにおいて推奨されている方法）に従って選択して下さい。  
**メタノール-アセトン固定**  
a. 冷メタノール中、-20℃で10分間固定します。  
b. 余分なエタノールを除去します。  
c. 冷アセトンで-20℃、1分間透過化処理します。  
**または**  
**パラホルムアルデヒド-Triton固定**  
a. 3~4%パラホルムアルデヒド中、10~20分間固定します。  
b. PBSで簡単にリンスします。  
c. 0.5%Triton X-100で2~10分間浸透処理します。  
**または**  
**パラホルムアルデヒド-メタノール固定**  
a. 3~4%パラホルムアルデヒド中、10~20分間固定します。  
b. PBSで簡単にリンスします。  
c. 冷メタノールで-20℃、5~10分間浸透処理します。  
**または**  
**PEM-エタノール固定**  
a. PEM緩衝液中、10分間固定します。  
b. PBSで簡単に2回リンスします。  
c. 冷エタノールで-20℃、5~10分間浸透処理します。  
2. PBSで3回（最低毎回5分間）洗浄します。

## ブロッキング(任意)

- 1%BSA含有PBS中で、30分間スライドをインキュベートします。ブロッキング剤として他に、二次抗体の宿主と同種動物の血清を5-10%添加する、または1%ゼラチンを添加する方法もあります。
- PBS中で5分以上、3回洗浄します。

## 一次抗体反応

- 一次抗体を、PBSで至適濃度に希釈します。カバースリップ上の細胞に滴し、室温で60分間インキュベートします（加湿チャンバーの使用をお勧めします）。
- PBSで3回（最低毎回5分間）洗浄します。

## 二次抗体反応

注記：二次抗体は間接法の場合のみ使用します。

- 二次抗体を、PBSで至適濃度に希釈します。カバースリップ上に滴し、室温で30分間インキュベートします。
- PBSで3回（最低毎回5分間）洗浄します。
- 余分なPBSを除去します。

## 免疫蛍光法 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、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	遮光して下さい(サンプルは、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(シグマ P3130) <sup>1</sup> やp-フェニレンジアミン(シグマ P1519) <sup>2</sup> 、DABCO(シグマ D2522) <sup>3,4,5</sup> 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。
	ホルマリウム固定 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(シグマ P7012)の0.01N HCl溶液、0.1%プロテアーゼ(シグマ P4789)のPBS溶液、あるいは10mM CaCl <sub>2</sub> を含む0.1%トリプシン(シグマ 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	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、シグマ 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') <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。
	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 <sup>6</sup>	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)100mMエ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。
組織の自己蛍光	グルタルアルデヒドが組織中の自己蛍光を誘導し、組織への抗体の浸透を減少させている <sup>7</sup>	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、組織の自己蛍光はフルオレセインフィルター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	蛍光バックグラウンド色素による自己蛍光の遮蔽を試して下さい。1%(v/v)ジメチルスルホキシド含有0.05%(w/v)Pontamine Sky Blue (Chicago Sky Blue 6B, シグマ C8679) PBS溶液は、フルオレセインフィルターの使用で赤色蛍光を発生します。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 <sup>6</sup> 。