

免疫組織化学染色

免疫組織化学染色は組織中の特異抗原の検出に有用な手法です。一般的な染色法では、最初に組織切片を脱パラフィン処理して再水和し、一次抗体をアプライします。続いて酵素標識二次抗体をアプライし、酵素特異基質を添加した後、特異的な染色をします。染色が弱い、または染色されない時には、酵素処理により抗原を露出させることが必要となる場合もあります。

以下は、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において、ペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ標識抗体を使用する方法です。

試薬および器具

1. ホルマリン固定、パラフィン包埋組織切片
2. 0.01Mリン酸緩衝化生理食塩水、pH7.4 (PBS) (シグマ P3813またはP4417-タブレット)
3. ウシ血清アルブミン (BSA) (シグマ A9647)
4. 希釈液：1%BSA含有PBS (シグマ P3688)
5. キシレン
6. 無水エタノール
7. 0.1%トリプシン (シグマ T7409) 含有PBS溶液またはトリプシンタブレット (シグマ T7168) 溶液 (4mM CaCl₂、200mM Tris、pH7.7)、または0.1%プロテアーゼ (シグマ P5380) 含有PBS溶液
8. マイクロウェーブ抗原回復液：10mM クエン酸ナトリウム緩衝液 pH6.0、1mM EDTA pH8.0
9. 抗原賦活化装置および抗原回復液
10. 一次抗体

11. **オプション1**：ビオチン標識二次抗体、およびExtrAvidin®ペルオキシダーゼ (シグマ E2886) またはExtrAvidin®アルカリホスファターゼ (シグマ E2636)
または
オプション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
12. ペルオキシダーゼ標識二次抗体またはExtrAvidin®ペルオキシダーゼ使用の場合：3%過酸化水素 (脱イオン水を使用し、30%保存液から直前に調製)
13. 酵素基質：酵素と必要な色により、ペルオキシダーゼの場合：AEC染色キット (シグマ AEC-101)、DAB (シグマ D4418またはD0426) アルカリホスファターゼの場合：ファストレッドTR/ナフトールAS-MX (シグマ B5655)
14. Mayer'sヘマトキシリン (シグマ MHS-1)
15. Coplin染瓶
16. マイクロウェーブ
17. 顕微鏡

プロトコール

スライドの調製

パラフィンの除去および再水和

1. スライドを、56~60℃のオープン中で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て下さい。)
2. キシレン槽に移し、5分間ずつ2回キシレンを交換します。
3. 余分な液を振り落とし、スライドを3分間ずつ2回、新鮮な無水エタノール中で再水和します。

- 余分な液体を振り落とし、スライドを新鮮な90%エタノール中に3分間静置します。
- 余分な液体を振り落とし、スライドを新鮮な80%エタノール中に3分間静置します。
- スライドを弱い流水で30秒間リンスします（洗い流したり固定が緩くなることのないよう、注意して下さい）。PBS槽に静置し、さらに再水和させます（室温で30分間）。

この操作の代わりに、脱パラフィン剤（キシレン代替剤）を用いることもできます。脱パラフィン剤添付の指示に従ってください。

抗原回復—抗原の露出

注記：このステップは染色が弱い、あるいは染色されない場合、または一次抗体の特異性により抗原の露出が必要な場合に限り行います。抗体と抗原により複数の回復方法が可能です。

- 酵素回復：**0.1%トリプシンまたは0.1%プロテアーゼのPBS溶液を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しても特異的な染色が増強されます。10分間PBSでリンスします。
- マイクロウェーブ回復：**スライドをdH₂Oで洗浄し、抗原回復液の入ったマイクロウェーブ耐性のプラスチック製染瓶に置きます。スライドが完全に溶液で覆われているかを確認して下さい。マイクロウェーブを高出力（～700W）で5分間作動します。終了後、スライドガラスに溶液がかぶっているかどうかを確認し、足りない場合は溶液を加えてからマイクロウェーブを繰り返します。この操作を2～3回繰り返して行います。室温で最低20分間、徐々に冷却してから次のステップへ進んで下さい。

3. 抗原賦活化装置による抗原回復

注記：固定したパラフィン包埋組織(4-7 μm厚)はSilane-Prep™やSuperFrost Plus®でスライド上にマウントし、不安定な組織や脂肪組織がはがれないようしておく必要があります。組織はスライド中央にマウントするほうが安全です。

- スライドをdH₂Oで数回洗浄します。この操作は「パラフィンの除去」のステップ3でパラフィンを除去した直後に行います。
- 抗原賦活化装置の圧力層に500mLのdH₂Oをいれ、赤いトグルスイッチを入れます。
- スライドをコンテナに設置し、250mLの抗原回復液を満たします。上記のように、層の中央部に設置するようにします。
- 抗原賦活化装置の指示書に従い、圧力装置を操作します。
- 温度が125℃まで上昇する、またはプログラムされた温度まで上昇（約10分）すると、圧力は0から18-24PSIまで上昇します。プログラムされた温度まで上昇すると“Heat On”ライトが消え、カウントダウンタイマーがスタートします。タイマーが0になるとアラームが知らせます。
- 温度が90℃になったらサイドアラームがなるので、そこでstart/stopボタンを押し、プログラムを終了します。
- 圧力は0になっているのを確認しチャンバーを開けます。スライドを取り出し、水道水で5分間、丁寧にリンスします。その後、室温で10分間、PBSに浸します。
- 10分間の冷却後、免疫染色のステップに進みます。

内在性ペルオキシダーゼの不活化

注記：このステップはペルオキシダーゼ標識二次抗体またはExtrAvidin®ペルオキシダーゼを使用する場合にのみ行います。

- スライドを水平な場所に置きます。このときスライドが互いに触れ合わないよう注意して下さい。また、途中で切片が乾燥しないよう注意して下さい。
- 3%過酸化水素水を充分量滴下して切片全体を覆います。
- 室温で5分間インキュベートします。
- 洗浄瓶を用いてPBSでリンスします。
- スライドをPBSの入った洗浄槽に2分間静置します。

一次抗体反応

注記

a. 一次抗体反応の前に5%BSAで10分間サンプルを前処理すると、バックグラウンド染色を低減することができます。動物組織の場合、二次抗体の宿主動物と同じ生物種の5～10%正常血清を使用すると良好な結果が得られます。

b. 至適希釈率と反応時間は、使用前に各一次抗体について確認する必要があります。

- 液を捨て、スライド上の余分な液体をよく振り落とし、各スライドの切片の周囲を注意深く拭き取ります。
- 一次抗体またはネガティブコントロールを、希釈液で至適濃度まで希釈します。希釈液自体を、ネガティブコントロールとして用いても構いません。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）も作製してください。
- 該当のスライドに、一次抗体を100 μLアプラインして切片を覆います。
- 各スライドを異なる二方向に傾けて、液体をスライド全体に均一に広げます。
- 加湿チャンバー中、37℃で最低60分間インキュベートします。抗原が低密度の場合には、反応時間の延長をお勧めします。
- 洗浄瓶を用いてPBSで穏やかにリンスします。スライドをPBSの入った洗浄槽に5分間静置します。

二次抗体反応

オプション1—ビオチン／ExtrAvidin®検出

- 液を捨て、スライド上の余分な液体をよく振り落とし、各スライドの切片の周囲を注意深く拭き取ります。
- ビオチン標識二次抗体を、希釈液で至適濃度に希釈します。
- 各々のスライドに二次抗体を100 μLアプラインして切片を覆います。
- 各スライドを異なる方向に傾けながら、液体を均一に広げます。
- 加湿チャンバー中、室温で最低30分間インキュベートします。
- 洗浄瓶を用いてPBSで穏やかにリンスします。
- スライドをPBSの入った洗浄槽に5分間静置します。

ExtrAvidin®反応

- 液を捨て、スライド上の余分な液体をよく振り落とし、各スライドの切片の周囲を注意深く拭き取ります。
- ExtrAvidin®ペルオキシダーゼまたはExtrAvidin®アルカリホスファターゼを、希釈液で至適濃度に希釈します。
- 各々のスライドに100 μLアプラインして切片を覆います。
- 各スライドを異なる二方向に傾けて、液体を均一に広げます。
- 加湿チャンバー中、室温で最低20分間インキュベートします。
- 洗浄瓶を用いてPBSで穏やかにリンスします。
- スライドをPBSの洗浄槽に5分間静置します。
- 基質の調製と発色のステップに移ります。

二次抗体反応

オプション2—酵素標識

- 液を捨て、スライド上の余分な液体をよく振り落とし、各スライドの切片の周囲を注意深く拭き取ります。
- 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、希釈液で至適濃度に希釈します。
- 各々のスライドに100 μLアプラインして切片を覆います。
- 各スライドを異なる二方向に傾けて、液体を均一に広げます。
- 加湿チャンバー中、37℃で30分間インキュベートします。
- 洗浄瓶を用いてPBSで穏やかにリンスします。
- スライドをPBSの洗浄槽に5分間静置します。

基質の調製

基質の混合は最後の洗浄ステップ中に行うことをお勧めします。

注記：アルカリホスファターゼ溶液に1mMレバミゾール（シグマ L9756）を添加すると内在性アルカリホスファターゼの活性が大幅に阻害されます（腸アイソザイムは除きます）。

発色

1. 液を捨て、スライド上の余分な液体をよく振り落とし、各スライドの切片の周囲を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アプライして切片を覆います。
3. 5~10分間、または顕微鏡でモニターしながら望ましい赤色反応が認められるまで、インキュベートします。ネガティブコントロールのバックグラウンドが染色される前に、洗浄瓶の蒸留水で穏やかにリンスし、反応を終了します。

対比染色

注記：AEC基質を使用する場合、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。この方法により形成されるACE染色は有機溶媒に可溶です。スライドは、脱水したり、トルエン（またはキシレン）の中に入れてたり、トルエンを含むマウント剤は使用しないで下さい。

1. 充分量のMayer'sヘマトキシリンをアプライして切片を覆うか、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. 使用したヘマトキシリンの強度に応じて、0.5~5分間インキュベートします。
3. 洗浄瓶を用いて蒸留水で穏やかにリンスします。
4. スライドを流水で穏やかに5分間リンスします（パラフィン切片を洗い流すと固定が緩くなりますので、切片部分に直接強い流水をあてないように注意して下さい）。
5. グリセロールゼラチンのような水性マウント剤を用いて切片をマウントします。透明なマニキュア液でカバースリップをシールしても構いません。

参考文献

1. Cuello, A.C. (Ed.), *Immunohistochemistry II*, Wiley Press, NY (1993)

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、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。
バックグラウンドが高い	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かを確認して下さい。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 ₂ O ₂ 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Fcレ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、厳しい条件にしてください。
	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	新しい過酸化水素(ペルオキシダーゼ系の場合)あるいはレバミゾール(アルカリホスファターゼ系の場合)をご使用下さい。	