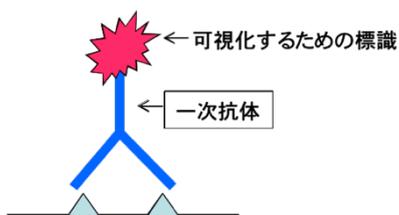


細胞免疫染色法 – DAB 染色法を中心に –

1) 免疫染色の原理

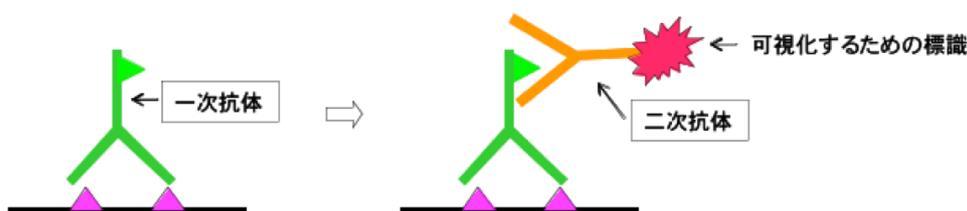
免疫組織化学法は抗原-抗体反応という特異的な結合反応を利用して、目的とする蛋白質の細胞内および組織内の局在を検出する手法である。方法は大まかに下記の2通り。

- ① 直接法: 抗原に対する特異的抗体である一次抗体に酵素や蛍光物質を直接結合させて検出する方法



- ② 間接法: 一次抗体に対する抗体である二次抗体を用いて可視化する方法

* 間接法ではシグナルを増強した高感度の検出が可能であり、かつ一次抗体にそのつど標識する手間がかからないという利点で現在広く利用されている。

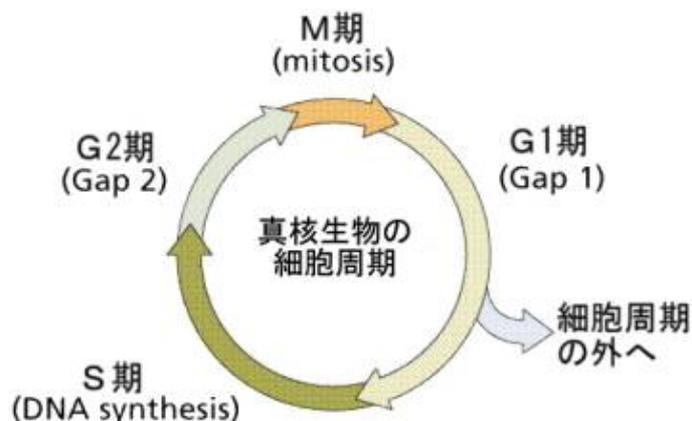


* 標識を可視化するためには大きく分けて以下の3通りの方法がある。

- i) 蛍光法-抗体に蛍光標識をつけておく
- ii) 酵素法-抗体に酵素を結合させ、発色基質を沈着させる
- iii) ABC 法-ビオチン化二次抗体を用いてそこに標識済みのアビジン-ビオチン複合体を結合させる増感度法

2) プロモデオキシウリジン(Bromodeoxyuridine: BrdU)について

プロモデオキシウリジン(BrdU)はチミジンのアナログであり、細胞周期のS期特異的にDNAに組み込まれる。すなわち細胞培地にBrdUを添加した場合、増殖期に入っている細胞の核に選択的に取り込まれることから、細胞全体におけるBrdU陽性細胞の比率を実際に測定することで増殖期に入っている細胞の割合(≒細胞の増殖能)を知ることが出来る(このBrdU陽性細胞の比率を一般にLabeling Indexと呼んでいる)。



参考:細胞周期のシエマ

③ 培養細胞における BrdU 免疫染色 (DAB 染色) の実際

- ① サンプル: 培養細胞の 35mmDish を PBS にて 2 回洗浄し、PBS をためておく(3 分～5 分おき)。
- ② 固定: PBS を捨て、70% cold ethanol にて 1 回洗浄した後、再度 70% cold ethanol を加えて 15 分間静置。
(1～2 ml/Dish)
* このステップで待機可能(-20°C 冷凍庫内)
- ③ 洗浄: PBS にて 2 回洗浄し、PBS をためておく(3 分～5 分おき)。
- ④ 塩酸処理 (DNA の二重鎖を切断するため): PBS を捨て、2～3N の濃度に調整した HCl を Dish 全面が浸る程度に加え(0.5～1ml/Dish)、30 分間静置。
- ⑤ 洗浄: PBS にて 2 回洗浄し、PBS をためておく(3 分～5 分おき)。
- ⑥ 内因性 Peroxidase のブロッキング: 3% H₂O₂ in cold methanol

Methanol: H₂O₂ = 100 ml : 1 ml
- ⑦ 洗浄: PBS にて 2 回洗浄し、PBS をためておく (このステップの洗浄は軽くて良い)。
- ⑧ ブロッキング: PBS を捨て、2 倍希釈の Block Ace[®] 原液(1 袋 4g を滅菌 PBS 100ml で溶解)を 1ml/Dish ずつ
加え 30 分～静置。
* このステップで待機可能(4°C 冷蔵庫内)
- ⑨ 洗浄: PBS にて 2 回洗浄し、PBS をためておく (このステップの洗浄は軽くて良い)。

- ⑩ **一次抗体**:PBS を捨てた後 Dish 底外縁を綿棒で拭い、一次抗体を Dish 1 枚に約 150 μ l ずつ apply する。

☆一次抗体に用いる**抗 BrdU 抗体** (mouse anti-human)は 400 倍希釈が至適濃度

- i) 抗体はなるべく on ice で取り扱い、予め至適濃度に希釈しておく。

※抗体は目減り分を考慮し少し多めに作っておいた方がよい

例: Dish 5 枚を染色する場合、1 枚 150 μ l \times 5 = 750 μ l の抗体が必要だが、目減り分を考慮し 800 μ l 分作成する

抗 BrdU 抗体 2 μ l を PBS で total 800 μ l に希釈 (\times 400) \rightarrow 150 ~ 160 μ l /Dish ずつ apply する

- ii) Dish 底外縁を綿棒で拭う事により、抗体を Dish の中心部にうまく apply 事が出来る。
iii) 抗体 apply 後は室温で 60 分 ~ 静置。

- ⑪ **洗浄**:PBS にて 2 回洗浄し、PBS をためておく(3 分 ~ 5 分おき)。

- ⑫ **二次抗体**:PBS を捨てた後、⑦のステップと同様に二次抗体を Dish 1 枚に約 150 μ l ずつ apply する。

☆二次抗体に用いる**ビオチン化抗マウス抗体**は 200 倍希釈が至適濃度

- i) 一次抗体と同様、二次抗体を綿棒で拭った Dish 1 枚に 150 μ l ずつ apply する。

例: Dish 5 枚を染色する場合

ビオチン化抗マウス抗体 4 μ l を PBS で total 800 μ l に希釈 (\times 200) \rightarrow 150 ~ 160 μ l /Dish ずつ apply する

- ii) 抗体 apply 後は室温で 30 分 ~ 静置 (この間にステップ⑪の溶液作成を!)。

- ⑬ **洗浄**:PBS にて 2 回洗浄し、PBS をためておく(3 分 ~ 5 分おき)

- ⑭ **酵素処理** (ABC reaction ; VECTASTAIN ABC Kit を使用する場合):

i) Sol.A を PBS で 100 倍希釈し Vortex にて攪拌する。

ii) 攪拌後の i) に Sol.A と同量の Sol.B を加え(100 倍希釈)、同様に Vortex にて攪拌する。

* Dish に apply する 30 分くらい前に溶液を作成しておく事

iii) 抗体と同様に Dish 1 枚に約 150 μ l ずつ apply し、30 分間静置(この間にステップ⑬の溶液作成を!)。

例: Dish 5 枚を染色する場合

i) Sol.A 8.0 μ l + PBS 800 μ l (\cong total 800 μ l) を Vortex にかける

ii) 後から i) に Sol.B 8.0 μ l を加え再度 Vortex にかける

iii) 150~160 μ l /Dish ずつ apply し、30 分間静置

⑮ 洗浄: PBS にて 2 回洗浄し、PBS をためておく(3 分~5 分おき)。

⑯ 発色操作 (DAB reaction):

※DAB = 3,3'-Diaminobenzidine は発癌性(+) → 使用時は必ず手袋を着用し、取り扱い・廃液の際は十分注意する事!

(皮膚・衣類に付着させない、廃液はシンクに流さず専用の廃液ボトルに回収する)

i) ①0.05M Tris-HCl 10ml + ②DAB 4mg (耳かき 1 杯分くらい: 少なめにした方が無難)を

10cc の DAB 用ビーカーに入れ、ホスターラーを用いて十分攪拌し溶解する。

ii) 使用直前に③ 30% H_2O_2 10 μ l を加え攪拌する。

iii) Dish の PBS を可及的に除去した後 Dish にスポイトで DAB 溶液(全体が十分浸る程度)を apply する。

iv) 発色反応を apply 直後から経時的に実体顕微鏡で観察し、適当な段階で水道水を加えて反応を止める。

* 反応は 15 秒~数分間程度で完了するので、発色反応が進みすぎないように十分注意する事!

(BrdU 染色の場合核が茶色く見えてきたら OK。細胞質が茶色になったら時間が長すぎる)

v) 水道水で 2 回洗浄し、10 分程度水道水をためておく。

⑰ 核染色:

i) 水道水を除去した後、ヘマトキシリン溶液をパスツールピペットで数滴加え全体になじませる(15~30 秒)。

ii) 軽く水道水で洗浄した後、水道水を 10~30 分程度ためて発色を安定させ、染まり具合を観察する。

* 染まりが弱い場合は再度 i)、ii) を繰り返す(ヘマトキシリン液に浸す時間を少し長くする)。

⑱ マウンティング: 水道水を除去した後、グリセロールを 2 滴たらして円形カバーガラスを乗せ、Air 抜きを行う。

⑲ 封入: Dish のフタをずらして箱に入れ、4°C 冷蔵庫内で over night 風乾した後、カバーガラスの周囲をマニキュアで密閉し封入する。 → 観察へ

4) Labeling Index (LI) の測定

LI(%) = 増殖期に入っている細胞の割合(%) = BrdU 陽性細胞数/全細胞数 × 100

例: 50 個の細胞で構成されているコクローニウム中、BrdU 陽性細胞が 15 個あった場合の LI
= 15(個)/50(個) × 100 = 30%

- ※ 核の周囲のみ染まっている細胞や染色体が染まっている細胞も BrdU 陽性とカウントすること
- ※ 死細胞の核および非実質細胞の核をカウントしないよう注意すること