

じっけんレシピ

～免疫組織染色の方法～

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に、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. 0.01 M リン酸緩衝化生理食塩水 (PBS)、pH 7.4 (製品番号: [P3813](#)-粉末または[P4417](#)-タブレット)
3. ウシ血清アルブミン (BSA) (製品番号: [A9647](#))
4. 希釈液: 1% BSA含有PBS (製品番号: [P3688](#))
5. キシレン (製品番号: [534056](#))
6. 無水エタノール (製品番号: [09-0780](#))
7. 0.1%トリプシン (製品番号: [T7409](#)) 含有PBS溶液またはトリプシントラレット (製品番号: [T7168](#))
溶液 (4 mM CaCl₂、200 mM Tris、pH7.7)
または 0.1%プロテアーゼ (製品番号: [P5380](#)) 含有PBS溶液
8. マイクロウェーブ抗原回復液: 10 mM クエン酸ナトリウム緩衝液 (製品番号: [S4641](#)) pH 6.0、1 mM EDTA pH 8.0 (製品番号: [E9884](#))
9. 抗原賦活化装置および抗原回復液 (詳細は下記に記載)
10. 1次抗体
11. 2次抗体と基質

2次抗体 ペルオキシダーゼ系の場合

ビオチン標識 2次抗体 + ExtrAvidinペルオキシダーゼ (製品番号: [E2886](#))
または ペルオキシダーゼ標識 2次抗体

基質

AEC染色キット(製品番号:[AEC101](#)) または DAB(製品番号: [D4418](#)または[D0426](#))

3% 過酸化水素溶液 (30% 溶液 (製品番号: [13-1920](#)) を直前に脱イオン水で希釈)

お問い合わせ先:

製品の技術的なご質問
価格・在庫のご質問

sialjpts@sial.com
sialjpcs@sial.com

じっけんレシピ

2次抗体 アルカリホスファターゼ系の場合

ビオチン標識 2次抗体 + ExtrAvidinアルカリホスファターゼ (製品番号: [E2636](#))
または アルカリホスファターゼ標識 2次抗体

基質

ファストレッドTR/ナフトールAS-MX (製品番号: [F4648](#))
または BCIP/NBT (製品番号: [B5655](#))

14. Mayer'sヘマトキシリン (製品番号: [MHS-1](#))
15. Coplin染瓶 (染色瓶)
16. マイクロウェーブ
17. 顕微鏡

プロトコール

<前処理>

脱パラフィン

(パラフィンの除去および再水和)

1. スライドを、56~60°Cのオーブン中で15分間置きます。(注意: オーブンの温度は60°C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。
4. 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。
5. 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。
6. スライドを弱い流水で30秒間 rinses 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)。

お問い合わせ先:

製品の技術的なご質問
価格・在庫のご質問sialjpts@sial.com
sialpcs@sial.com

じっけんレシピ

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考えられています。

1. 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°C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。
2. マイクロウェーブ回復：スライドを蒸留水で洗浄し、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（約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™スライド（製品番号：[S4651](#)）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に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。

- a. スライドを蒸留水で数回洗浄します。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。
- b. 抗原賦活化装置の圧力層に500mLの蒸留水をいれ、赤いトグルスイッチを入れます。
- c. 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。
- d. 抗原賦活化装置の指示書に従い、圧力装置を操作します。
- e. 温度が125°C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18-24 PSI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。
- f. 温度が90°C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。
- g. 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。
- h. 10分間の冷却後、免疫染色のステップに進みます。

お問い合わせ先：

製品の技術的なご質問
価格・在庫のご質問sialjpts@sial.com
sialjpcs@sial.com

じっけんレシピ

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2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。

1. 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。
2. 3% 過酸化水素水を充分量滴下して切片全体を覆います。
3. 室温で5分間インキュベートします。
4. 洗浄瓶を用いてPBSでリンスします。
5. スライドをPBSの入った洗浄槽に2分間静置します。

抗体反応

<1次抗体反応>

注記：

- a. 1次抗体反応の前に5%ウシ血清アルブミン（BSA）（製品番号：[A9647](#)）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あります。また動物組織の場合、2次抗体の宿主動物と同じ生物種の正常血清を5~10%で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1次抗体について検討する必要があります。
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. 1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（推奨希釈倍率の記載があっても、最適な抗体の希釈倍率は異なることがありますので、それぞれご検討下さい）。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。

お問い合わせ先：

製品の技術的なご質問
価格・在庫のご質問

sialjpts@sial.com
sialjpcs@sial.com

じっけんレシピ

3. 該当のスライドに、一次抗体を100 μ Lアプライして切片を覆います。
4. 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。
5. 加湿チャンバー中、37°Cで最低60分間インキュベートします。目的の抗原が少ない場合には、反応時間の延長をお勧めします。
6. 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。

<2次抗体反応>

オプション1—ビオチン標識2次抗体 + ExtrAvidin

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. ビオチン標識2次抗体を、希釈液で至適濃度に希釈します。
3. 各々のスライドに2次抗体を100 μ Lアプライして切片を覆います。
4. 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。
5. 加湿チャンバー中、室温で最低30~60分間インキュベートします。
6. 洗浄瓶を用いてPBSで穏やかにリンスします。
7. 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

8. 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。
9. 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、希釈液で最適濃度に希釈します。
10. 各々のスライドに100 μ Lアプライして切片を覆います。
11. 各スライドを異なる2方向に傾けて、液体を均一に広げます。
12. 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。
13. 洗浄瓶を用いてPBSで穏やかにリンスします。
14. スライドをPBSの洗浄槽に5分間静置します。
15. 基質の調製と発色のステップに移ります。

お問い合わせ先:

製品の技術的なご質問
価格・在庫のご質問sialjpts@sial.com
sialjpcs@sial.com

じっけんレシピ

オプション2—酵素標識抗体

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. ペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ標識2次抗体を、希釈液で至適濃度に希釈します。
3. 各々のスライドに100 μ Lアプライして切片を覆います。
4. 各スライドを異なる2方向に傾けて、液体を均一に広げます。
5. 加湿チャンバー中、37°Cで30分間インキュベートします。
6. 洗浄瓶を用いてPBSで穏やかにリンスします。
7. スライドをPBSの洗浄槽に5分間静置します。

基質の調整

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。

アルカリホスファターゼ溶液に1 mM レバミゾール（製品番号：[L9756](#)）を添加すると、腸アイソザイム以外の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。

<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発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）中に入れたり、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。

お問い合わせ先:

製品の技術的なご質問
価格・在庫のご質問

sialjpts@sial.com
sialjpcs@sial.com

じっけんレシピ

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)

トランスルシューティング

・ シグナルが検出されない、もしくは弱い場合

考えられる原因	解決策
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などで抗原の発現を確認する、または由来動物によっては目的タンパク質と反応しない場合があります。文献やアミノ酸配列データなどを研究者の方にてご確認ください。
抗体に認識されるエピトープが過度の抗原回復処理により破壊された	最適な処理方法をお決めください。
抗体が至適濃度でない	希釈倍率を検討して、1次抗体の至適濃度をお決めください。（抗体の希釈倍率を下げ、抗体濃度を高くするなど）
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ください。
アルデヒド固定による架橋のため、1次抗体が認識エピトープと反応していない。	プロテアーゼによる露出処理をご検討ください。
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する。 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ください。
基質や標識体が弱い、または保存状況などにより失活している	標識体と基質の活性を確認してください。（基質溶液に酵素標識体を加えると色が変わるはずです。）
使用する基質やその調整方法が誤っている。	基質が適切かご確認ください。必要な場合には新しいH ₂ O ₂ を加えて確認してください。

お問い合わせ先:

製品の技術的なご質問
価格・在庫のご質問sialjpts@sial.com
sialjpcs@sial.com

じっけんレシピ

・バックグラウンドが高い場合

考えられる原因	解決策
凝集している	マイクロ遠心機で抗体を短時間遠心し、凝集した抗体を除去してください。
抗体が至適濃度でない	希釈倍率を検討して、1次抗体や2次抗体の至適濃度の検討をしてください。(抗体の希釈倍率を上げ、抗体濃度を低くするなど)
抗体が細胞表面のFcレセプターに結合している、また非特異的に細胞成分に結合している	サンプルを10%血清(2次抗体の宿主動物と同じ動物種由来の血清)とインキュベートし、標識抗体をアプライする前にFcレセプターをブロッキングします。 F(ab') ₂ フラグメントの標識2次抗体を使用するとバックグラウンドが低減されます。
洗浄が十分でない	洗浄の回数を増やす
ブロッキングが適切でない	BSAや血清のインキュベーション時間を長くするか、濃度を高くしてください。または、別のブロッキング試薬をご確認ください。
2次抗体が交差反応している	サンプルと2次抗体を反応させて、非特異反応の有無を確認してください。組織サンプルと同じ動物種の免疫グロブリン、または血清吸着済み2次抗体を用いてください。
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ください。
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する
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)、またはレバミゾール(アルカリフォスファターゼ系の場合)をご使用ください。

お問い合わせ先:

製品の技術的なご質問
価格・在庫のご質問sialjpts@sial.com
sialpcs@sial.com