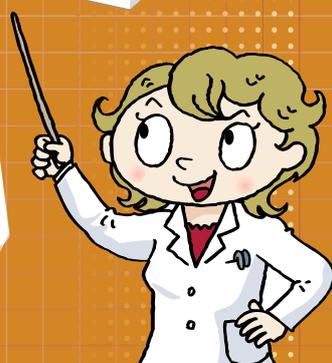
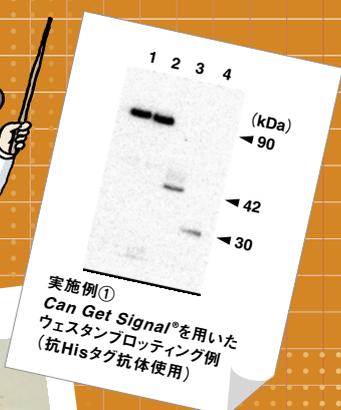
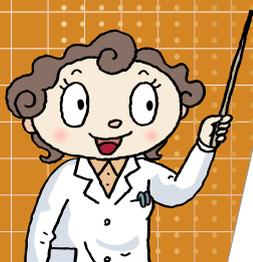


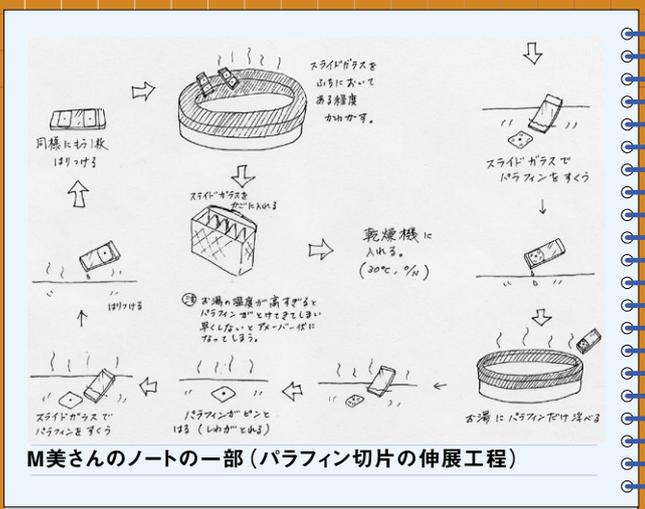
私にもできた

● ライフサイエンス実験シリーズ ● ● ● ● VOL.3

ウェスタンブロッティング・免疫組織染色編

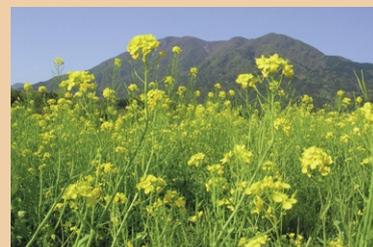


M美さん・アシスタント



技術の多様化とともに、日々の研究におけるライフサイエンス研究試薬・キットの担う役割は日に日に大きくなってきているようです。その一方で、情報が増えすぎて反対に効率的な研究ができなくなっているとの声も聞かれます。本シリーズは、そのような情報を一旦整理し、弊社研究員の実際のノートなども紹介しながら、初心者の方にも分かりやすくライフサイエンス実験を解説できないか、との趣旨から企画されました。

前号は、『遺伝子発現解析 (前編)』をお届けさせていただきました。よって今号は、後編となる



研究所近郊の風景 (5月)

はずでしたが、予定を変更して、皆様からのご要望の多かった『ウェスタンブロッティング・免疫組織染色編』とさせていただきます。タンパク質の発現解析は、ライフサイエンス研究分野で欠くことのできない解析手法の一つであり、今後、ますますその重要性が高まることが予想されます。本稿が、皆様の研究の一助となれば幸いです。

A子さんも社員としての試練の時がやって来たようです。新たな課題が課せられました。

今までの登場人物



A子さん
研修中のT社の
新入社員



TKさん
プロテオミクス
研究チームの
リーダー



AKさん
同チームの
Aさんの先輩

1 タンパク質の解析技術の周辺の周辺

4種類の塩基のみからなるDNAやRNAと比べ、20種類のアミノ酸からなるタンパク質は、様々な性質を示すために、その解析方法も実に多種多様です。当然、それに応じた解析テクニックや小技なども種々進化してきているようです。

1-1 キムワイプで脱色は当たり前?

クマシーブリアントブルー (CBB) 染色したポリアクリルアミドゲルの脱色作業は時間がかかるため、実にいらいらさせられるステップです。また、急げば急ぐほどどこちなくなってしまう、脱色液を棄てようとした瞬間にゲルを流し台に落として悲惨な目に会った方も多いはずです。

いつの頃からは分かりませんが、脱色するときにキムワイプを丸めて脱色液に浮かべるといふ光景が見られるようになりました。キムワイプは余分な色素を吸着する力が強く、一定時間毎に交換することで、脱色液を頻りに廃棄する必要がなくなります。脱色液も貴重な資源ですし、どんどん流しに棄ててしまうのも考え物ですので、本当に良い方法です。また中には、活性炭を詰めた大きなオープンカラムを立てておいて、脱色液をリサイクルしている研究室もあるようです。皆さんの研究室ではいかがでしょうか?

1-2 ジグソーパズルの直しかた

染色時にポリアクリルアミドゲルが割れてしまうことも日常茶飯事のアクシデントです。一度割れてしまったゲルの修復に関しては、なかなか良い方法はないのが現実です。きれいに貼り合わせることができても、そのまま乾燥させてしまうと、せっかくの接合部分が断層のようになってしまい、なかなかうまく修復できません。

重要な実験ならば、もう一度泳動からやり直すことをお勧めしますが、参考としてノートに貼っておく程度であれば、乾燥する前に写真撮影するという手があります。皆さんの研究室には、アガロースゲルのUV撮影装置があるはず。もし白色灯が点灯できるようになっていれば、それを利用して撮影可能です。具体的な方法としては、まず、白いプラスチック板、もしくは白い紙の上にラップを敷いたものの上に水を少々垂らし、その上に割れたゲルを乗せ、静かに貼り合わせます。接合部分が目立つ場合は、ゲルの上にも水を少しかけると目立たなくなります。そして絞りとコントラストを調整しつつ、ゲルを撮影します。当然、単なるデータの保存用としても便利です。

少なくとも弊社のFASシステムには白色灯機能が付いていますので、もしお持ちでしたら試してみてください。

ただ、乾燥の失敗でバラバラになったゲルは、さすがに現在の科学技術を駆使しても修復困難ですので、ご注意ください。



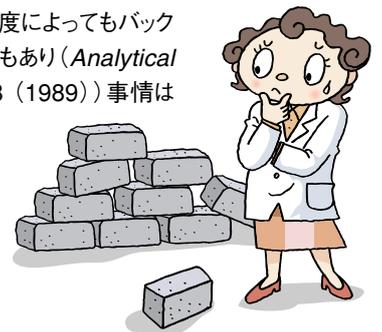
1-3 加熱すべきか、せざるべきか

通常のSDS-PAGE解析において、泳動前にサンプルを煮沸することが広く行われていますが、それが解析の妨げになることもあるようです。特に膜タンパク質など、極度に疎水性の高い領域を有するタンパク質は、加熱することで強く凝集してしまい、正常に泳動されないことがあります。そのようなサンプルは色素と混合した後に、37°Cでインキュベートする程度に留めることで、正常に泳動される可能性が高まるようです(*Nature Methods* 3: 303-313 (2006))。ただ、どちらにしても、極度に疎水性の高いタンパク質は、SDS-PAGE解析によっては、正しい分子量が求められないことも多いですので、それは頭の中に入れておいた方が良いでしょう。

1-4 分かっているようで難しいブロッキング

免疫反応を用いる検出系はブロッキングによって結果が大きく左右されることも多く、良い条件を見出せるかが実験の鍵となることも珍しくありません。今日まで、実に多くのブロッキング剤が報告されています。ざっと挙げるだけでも、スキムミルク、カゼイン、アルブミン、ゼラチン、血清、界面活性剤、ポリビニルアルコールなどの人工ポリマー、およびそれらの混合物など多種多様です。ブロッキングに適しているタンパク質やポリマーは、単に疎水性が高いだけでないことは分かっていますが、どのような物質がブロッキングに向くかはまだ未解明な部分も多いようです。また、今回の話の中でも取り上げますが、ブロッキングの効果は、検出するタンパク質や抗体によって様々なようです。よって、自分で見出した絶妙なブレンドのブロッキング剤を隠し持っている方も多いのではないのでしょうか?

さらに、ブロッキングを行う温度によってもバックグラウンドが異なるという報告もあり(*Analytical Biochemistry* 177: 256-258 (1989)) 事情はさらに複雑なようです。



1-5 リン酸化タンパク質検出方法あれこれ

シグナル伝達の研究などで、リン酸化されたタンパク質を検出する実験が多くなっているようです。特異的な検出方法は、やはり抗体に頼るほか無いようですが、サンプル中に存在するリン酸化タンパク質を網羅的に検出する試薬なども種々開発されてきているようです。その中でも、Phos-tag[®]ビオチン(Nard社)はタンパク質をPVDF膜にトランスファーした後、リン酸化タンパク質をウェスタンブロットティングの要領で検出できる便利な方法の一つです(*Mol. Cell. Proteomics* 5: 749-757 (2006))。

2 実践!ウェスタンブロットティング・免疫組織染色

A子さんはT社バイオ研究所のライフサイエンス試薬開発グループに配属された新人研究員です。大学時代には少し異なる分野の研究を行っていたことから、しばらく様々なテーマで研修を行っています。既にプロテオミクス研究チームにおいて、「遺伝子クローニング」と「遺伝子発現解析の基礎部分」に関しては研修を終了し(本誌Vol.1・2参照)、次のチームで引き続き研修する予定になっていました。しかし、A子さんは、なぜか同じチームに居残って何やら実験をしているようです。

実は、2月から研究所の学術担当が産休のため、A子さんは急遽その業務の代行をしています。A子さんは、そろそろ入社一年目ですし、会社の業務に関わることができて益々張り切っているようです。A子さんはこういう仕事にあこがれて試薬メーカーに就職したのです。今週末からチームリーダーのTKさんと先輩のAKさんは3週間ほど海外出張へ出かけます。その間、A子さんには以下のような課題が出されています。この指示を出す、二人は準備のためバタバタと出て行きました。

課題:

●ウェスタンブロットティングと免疫組織染色の事例集を作成すること。

・TKリーダーからのコメント

「免疫系の検出ではブロッティングがとても大切です。それについても検討事例をつくってくれるとありがたいです。」

・AK先輩からのコメント

「ストッカーに、様々な組み合わせの抗原サンプルと抗体を準備しています。

細かい条件を書いた資料も残してゆきます。詳細は、アシスタントのM美さんに聞いてください。」

A子さんは、早速実験に取り掛かる準備をしています。

一方、M美さんは、上司のいない間に、新人のA子さん一人を残して有給休暇を取って久しぶりの旅行に出かけてしまいました。伝達ミスがないと良いのですが…。

2-1 どれがシグナル?

ウェスタンブロットティングに挑戦

実を言うと、ウェスタンブロットティングはA子さんの得意分野です。思い起こせば免疫沈降実験などに明け暮れた学生時代でした。この研究所で用いている装置や試薬は、A子さんが学生時代に使っていたものとはほぼ同じのようです。A子さんはとりあえず一通り自分で行えるところまで行ってみることにしました。まずは指示通り、無細胞タンパク質合成法で合成した数種類のHisタグタンパク質とA431細胞破碎液中のEGFR (Epidermal growth factor receptor) をターゲットとしてウェスタンブロットティング解析を行うことにしました。抗体の希釈率等は指示書に細かく書かれていたのでそれに従うことにしました。

A子さんは、学生時代に作成したマニュアル(プロトコル#1など)を確認しながら、スムーズに工程を進めてゆきました。検出には指示通りルミノール発光を原理とするA社のキットを用い、発光は自社の微弱発光検出装置FAS-1000 (Code No: FAS-1000)を用いて検出を行います。さすがに慣れているだけあってかなりの手際の良さです。

しかし、FAS-1000のモニターの前で、A子さんは黙り込んでいます。Hisタグ検出の方はいつまで待っても何もシグナルが出てきません。一方、EGFRの方は明瞭なバンドが得られましたが、目的の分子量の位置ではありません。A子さんはもう一度プロトコルを見直しましたが、原因がはっきりしません。こうなるとは、翌週帰ってくるM美さんを待つしかありません。しかも、通信のトラブルで海外の二人ともメール連絡できなくなっています。とにかく、どこかを間違っているはず

【プロトコル#1】PVDF膜を用いるセミドライ式トランスファー

- (1) PVDF膜を使用する大きさに切断します。
- (2) 切断したPVDF膜をメタノールに浸し、1分間振とうします。
- (3) PVDF膜を蒸留水に浸し、5分間振とうします。
- (4) PVDF膜をトランスファーバッファーに浸し、10分間振とうします。
- (5) PVDF膜よりやや大きめに切断したろ紙を8枚用意します。
- (6) 切断したろ紙を、トランスファーバッファーに浸します。
- (7) 陰極側から、ろ紙4枚→SDS-PAGEのゲル→PVDF膜→ろ紙4枚→陽極側の順に重ねます。
- (8) PVDF膜の面積(cm²) × 0.8 mAを目安に、1時間電流を流します。
- (9) 転写終了後、TBS-TもしくはPBS-TにPVDF膜を浸し、5分間振とうして膜を洗浄します。

⇒ブロッティング工程へ

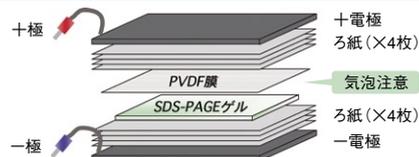


図1

ワンポイントメモ ①

通常はプロトコル#1の条件で、8割程度のタンパク質がPVDF膜に転写されます。しかし、転写効率はタンパク質の分子量やゲルの濃度に大きく依存しますので、良好な結果が得られない場合は、プレステインドタンパク質マーカーの転写効率を指標に、最適条件を検討する必要があります。また、タンパク質によっては、ウエット式の方が良好な結果が得られることも多いようです(特に高分子量のもの)。ただ、ウエット式は時間がかかる、冷却装置が必要、等の欠点もあるようです。

ワンポイントメモ ② 試薬調製法

トランスファーバッファー(セミドライ用)(IL)

192 mM Glycine (MW=75.07)

25 mM Tris (MW=121.14)

20%(V/V) メタノール

Glycine:14.4g、Tris:3.0g、およびメタノール:200mlを秤量し、蒸留水で1Lにフィルアップします。(室温保存)

2-2 Can I get signals?

翌週、M美さんが旅行から戻ってきました。そして、開口一番、「自社の試薬はどこに使ったの?」というコメントが返ってきました。M美さんのコメントはいつも辛口で直球です。ただ、確かにM美さんの言うとおり、抗体の一部はうちと取引のある海外メーカーのものですが、自社製品は使っていません。これでは、何のために資料を作成しているのか意味不明です。

実を言うと、今回の課題は『Can Get Signal[®]』という商品の販促事例を作るというものだったようです。AK先輩が残していった資料を良く見ると、1次抗体はSolution 1、そして2次抗体はSolution 2に溶解するようにとの指示が書いてありました。これらの溶液は、この商品に含まれるバッファの名前です。よく見ると冷蔵庫にもきちんとその試薬が並べておいてありました。M美さんは、当然、AKさんが詳しい説明をしてくれていると信じて旅行に出かけてしまったようです。後から分かったのですが、なんとこの試薬はAK先輩が開発した試薬でした。

A子さんは、いくら新商品であったとはいえ、自社製品の知識が不足していたことを反省しました。

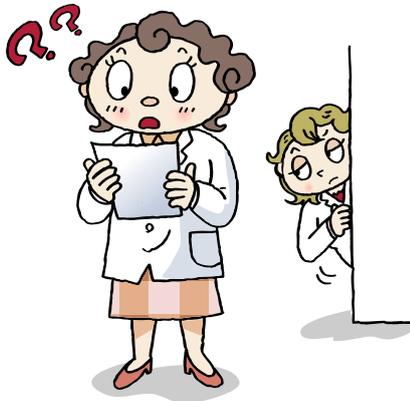


図2 Can Get Signal[®] シリーズ試薬

- Can Get Signal[®] Immunoreaction Enhancer Solution (左) ウェスタンブロッティング、ドットブロッティング、ELISA用
- Can Get Signal[®] immunostain Immunoreaction Enhancer Solution (右) 免疫組織染色用



図3 微弱化学発光撮影装置: FAS-1000

少し調べたところ、Can Get Signal[®] Immunoreaction Enhancer Solution (以下Can Get Signal[®])、およびCan Get Signal[®] immunostainには、以下のような特長があるようです。

Can Get Signal[®] シリーズの特長

- 1 (Can Get Signal[®]) ウェスタンブロッティング、ドットブロッティング、およびELISAにおけるシグナルを増強し、S/Nを改善する。
(Can Get Signal[®] immunostain) 免疫組織染色におけるシグナルを増強し、S/Nを改善する。
- 2 1次抗体反応、および2次(標識)抗体反応の反応溶液として用いる。
- 3 ブロッキングや検出のステップは今までの方法をそのまま用いることができる。

※Can Get Signal[®] はブロッキングには用いることはできません。

【プロトコール#2】

Can Get Signal[®] を用いるウェスタンブロッティングフロー

※ブロッキングや抗体反応はハイブリバグなどを用いて行うこともできます。ただ、あまり液量を減らしすぎるとムラの原因になりますのでご注意ください。100cm²の膜で、5~10mlが目安です。

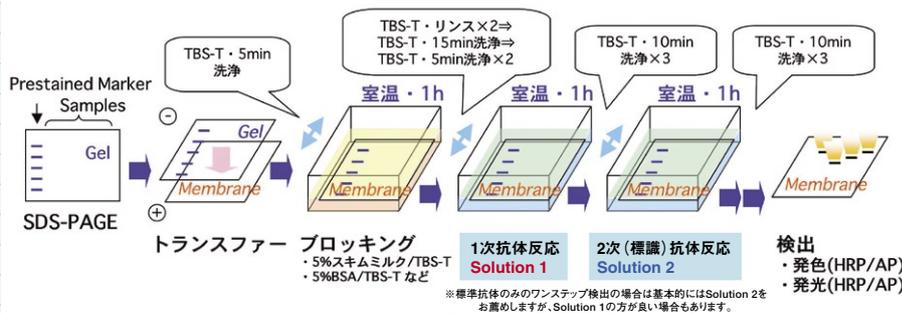


図4

【プロトコール#3】

Can Get Signal[®] を用いるサンドイッチELISAフロー

※プロトコール#2,3ともに、反応に用いる抗体の濃度は、推奨濃度からはじめて、減らしてゆく方向で検討します。

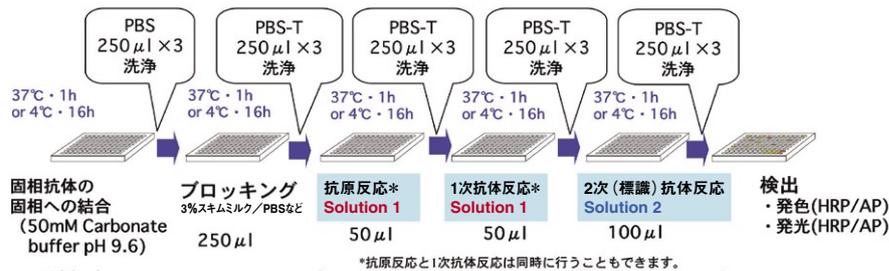


図5

今回、A子さんは、学生時代行っていた方法に従って、抗原抗体反応にTBS-Tを用いてしまいました。明らかにこのステップが問題だったに違いありません。M美さんは何も言いませんでしたが、少し冷やかな視線をA子さんに浴びせかけているようです。当然ながら、M美さんもこの試薬の開発に携わったメンバーの一人でした。

翌日、A子さんは、M美さんに手伝ってもらって最初からやり直してみました。ただ、前回のプロトコルの試薬を2箇所置き換えるだけなので、簡単です(プロトコル#2)。そして図6、7のような結果が得られました。図6は明らかに反応性が向上し、図7は反応性および特異性が向上しています。M美さん曰く、この試薬は反応性に乏しい抗体や特異性の甘い抗体に特に効果があるそうです。

A子さんは、AK先輩を少し見直しました。T社ではかなり以前から免疫関連の診断薬やキットなどを開発していて、AK先輩がそれらのノウハウをライフサイエンス関連のキットへ応用したのだそうです。

要するにこの試薬は、この前使用したPerfectHyb™ hybridization solution(本誌前号参照)の免疫検出版、つまり、バッファーを最適化することで抗体の反応性を改善する試薬のようです。M美さん曰く、元々TBS-Tなどのバッファーは、免疫反応に至適化されている訳ではないとのこと。

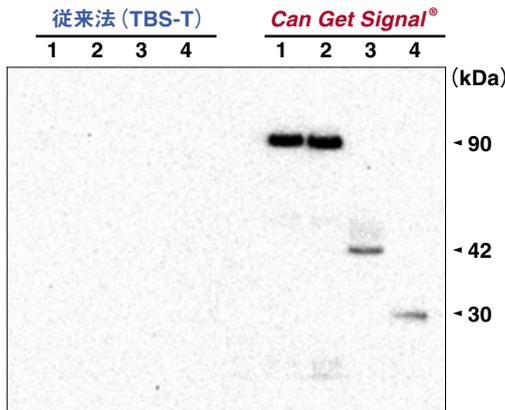


図6 Can Get Signal®を用いたHis-tagタンパク質の検出

サンプル:無細胞タンパク質合成法にて合成した6xHisタンパク質 (Crude)
 1: 6×His-Catalase fusion protein
 2: 6×His-Catalase fusion protein
 3: 6×His-c-fos
 4: 6×His-c-jun
 1次抗体:抗Hisタグrabbitポリクローナル抗体 (1:2,000希釈)
 2次抗体:抗rabbit IgG-HRP抗体 (1:20,000希釈)
 ブロッキング:5%スキムミルク/TBS-T

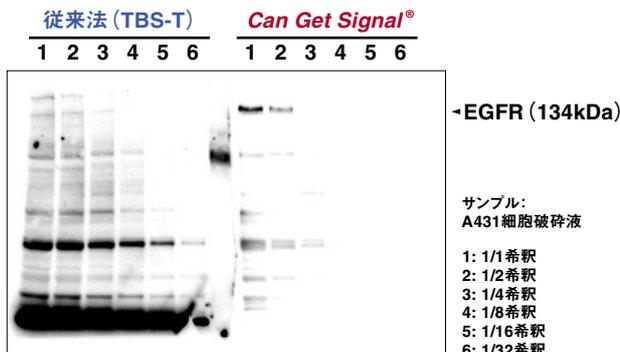


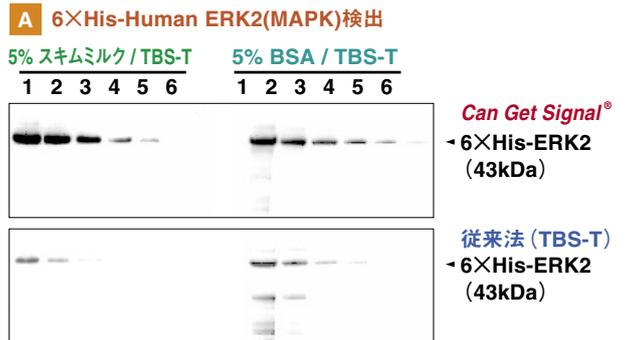
図7 Can Get Signal®を用いたHuman EGFR (Epidermal growth factor receptor) の検出

1次抗体:抗human EGFR mouseポリクローナル抗体 (1:2,000希釈)
 2次抗体:抗mouse IgG-HRP抗体 (1:20,000希釈)
 ブロッキング:5%スキムミルク/TBS-T

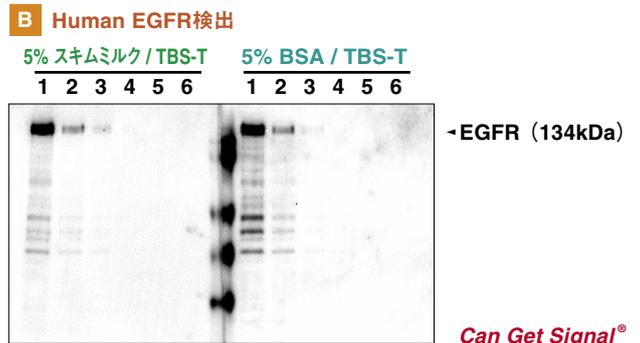
2-3 ブロッキング条件を制するものは…

次にA子さんは、課題として出されていた、ブロッキング剤の違いによるウェスタンブロットングの検出効率の比較データを集めることにしました。先ほどの二つの実験には、5%スキムミルク/TBS-Tを用いたので、それと5%BSA(牛血清アルブミン)/TBS-Tを比較しようと思っています。BSAはゼラチンと並んで良く使用されるブロッキング試薬です。A子さんも学生時代は愛用していました。

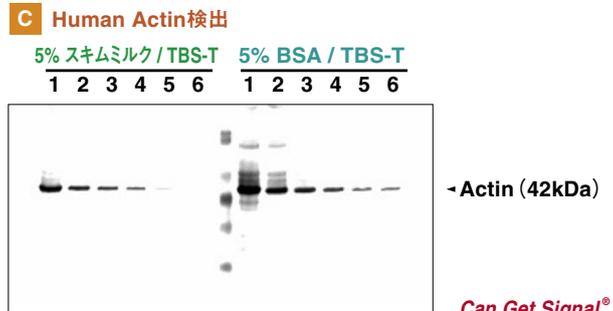
コツを掴んだA子さんは次々と事例を作成してゆきました。



サンプル:無細胞タンパク質合成法にて合成した6×His-ERK2(MAPK) (Crude)
 < 1:1/1希釈, 2:1/2, 3:1/4, 4:1/8, 5:1/16, 6:1/32 >
 1次抗体:抗Hisタグrabbitポリクローナル抗体 (1:1,000希釈)
 2次抗体:抗rabbit IgG-HRP (1:20,000希釈)



サンプル:A431細胞破砕液
 < 1:1/1希釈, 2:1/2, 3:1/4, 4:1/8, 5:1/16, 6:1/32 >
 1次抗体:抗EGFR rabbitポリクローナル抗体 (1:1,000希釈)
 2次抗体:抗rabbit IgG-HRP (1:10,000希釈)



サンプル:HeLa細胞破砕液
 < 1:1/1希釈, 2:1/2, 3:1/4, 4:1/8, 5:1/16, 6:1/32 >
 1次抗体:抗Actin goatポリクローナル抗体 (1:1,000希釈)
 2次抗体:抗goat IgG-HRP (1:10,000希釈)

図8 ブロッキングによる検出効率の比較



得られたデータは図8に示すようなものでした。確かにブロッキングの条件によって、検出率や特異性がかなり異なるようです。この結果には意外だったらしく、辛口のM美さんもしきりに感心しています。この実験結果からは、スキムミルクを用いると特異性が改善され、一方、BSAを用いると測定感度が向上しているようにも見えます。しかし今回は事例が少なく、一概に結論を下すことは難しそうです。二人の結論は、「とりあえず最初の実験の時に、5%スキムミルク/TBS-Tと5%BSA/TBS-Tを両方試して見るのが良いだろう」というところに落ち着きました。

ワンポイントメモ ③

プロテインキナーゼ研究におけるリン酸化タンパク質の検出も、厄介な実験の一つです。先ほどの抗Hisタグ抗体と同じく、反応性と特異性に優れた抗体の取得は難しいようです。そのような抗体に対しても、Can Get Signal®は効果があるようです。

下の事例は、宮崎大学医学部薬理学講座・柳田俊彦先生、和田明彦先生にご提供いただいた実験例ですが、どちらも反応性と特異性が明らかに向上していることが分かります。

Can Get Signal® 従来法 (TBS-T)

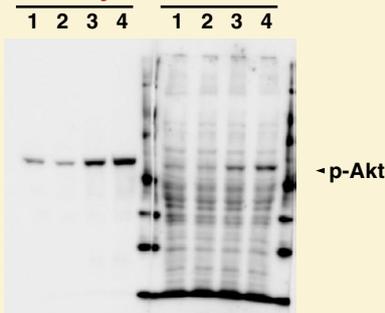


図9 抗phospho-Akt抗体によるAktリン酸化の検出結果

サンプル: 培養ウシ副腎髄質細胞

1. Control (H₂O) 2. Insulin (1 nM, 5分刺激)
3. Insulin (10 nM, 5分刺激) 4. Insulin (100 nM, 5分刺激)
1次抗体: 抗Phospho-Akt rabbit ポリクローナル抗体 (1:2000希釈)
2次抗体: 抗rabbit-HRP抗体 (1:20,000希釈)

Can Get Signal® 従来法 (TBS-T)

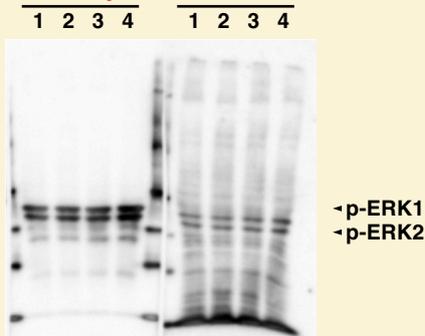


図10 抗phospho-ERK抗体によるERKリン酸化の検出結果

サンプル: 培養ウシ副腎髄質細胞

1. Control (H₂O) 2. Insulin (1 nM, 5分刺激)
3. Insulin (10 nM, 5分刺激) 4. Insulin (100 nM, 5分刺激)
1次抗体: 抗Phospho-ERK モノクローナル抗体 (1:2000希釈)
2次抗体: 抗mouse-HRP抗体 (1:20,000希釈)

※(参考文献) J. Neurochemistry 98:20-33 (2006)
※弊社情報誌UPLOAD Vol.77 p9で詳細をご覧ください。
(弊社ホームページでご参照いただけます)

2-4 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)への応用

ついでに、A子さんは図8Aの実験に使用した抗原と抗体の組み合わせを使ってサンドイッチELISA解析にチャレンジしてみることにしました。解析フローは、プロトコール#3に示したように、抗原・抗体反応工程にCan Get Signal®を用いる以外は、通常のELISAのプロトコールと全く同じです。今回、Can Get Signal®のコントロールにはELISA用に市販されているブロッキング試薬を用いました。また、検出にはTMBを使用しました。

結果は、意外なほどくっきりしたものでした(図11)。反応性の悪い抗体ほど効果が明瞭に出るというM美さんの説明はELISAにも当てはまるようです。

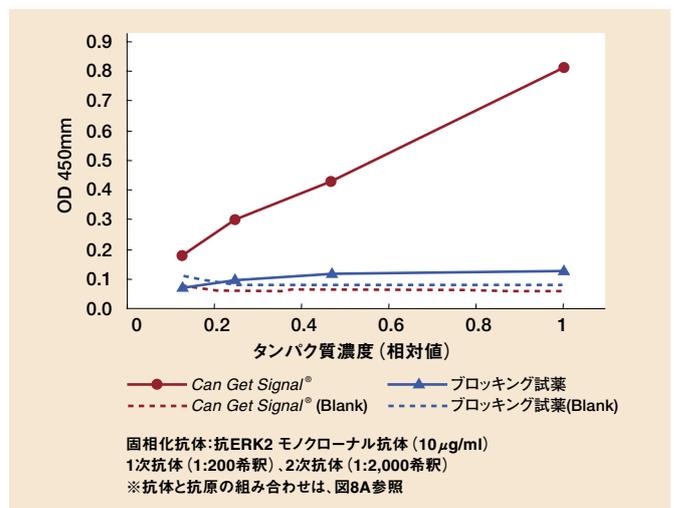


図11 サンドイッチELISA法を用いたHis-ERK2タンパク質の検出

表1 試薬選択の指標

| 商品名 | 用途 | 使用法 |
|-----------------------------|---|--|
| Can Get Signal® | ・ウェスタン プロットティング ・ドットプロットティング ・ELISA等 | <p>■ ウェスタンプロットティング・ドットプロットティング (2種類の抗体を使用する場合) 1次抗体反応 ⇒ Solution 1 2次(標識)抗体反応 ⇒ Solution 2</p> <p>■ サンドイッチELISA 固相抗体 ⇒ 炭酸バッファーなどで固定化 抗原反応 ⇒ Solution 1 1次抗体反応 ⇒ Solution 1 2次(標識)抗体反応 ⇒ Solution 2</p> <p>※直接標識抗体を使用する場合 標識抗体反応 ⇒ Solution 2 (場合によってはSolution 1)</p> |
| Can Get Signal® immunostain | 免疫染色 (組織・細胞等) <発色法・蛍光法に対応> | <p>● パターン1 1次抗体 ⇒ Solution A 2次(標識)抗体 ⇒ Solution A</p> <p>● パターン2 1次抗体 ⇒ Solution B 2次(標識)抗体 ⇒ Solution B</p> <p>※初回使用時に両方の試薬をテストします。2液を検討することで、より広範に条件検討でき、成功率を向上させることができます。</p> <p>※あらかじめ使用濃度に調整された2次(標識)抗体や、ポリマーコンプレックス法の試薬を用いる場合、本試薬は1次抗体の反応のみに使用します。</p> |

※反応に用いる抗体の濃度は、推奨濃度からはじめて、減らしてゆく方向で検討します。
※シグナルが増強されていることを考慮して、検出時に露光時間を短めに設定する方が良い場合があります。

2-5 免疫組織染色にチャレンジ!

あっという間に2週間が過ぎました。ついに来週あの二人が帰ってきます。それまでに免疫組織染色の事例を作らなくてはなりません。今週、A子さんはM美さんに免疫組織染色の手ほどきをお願いしました。A子さんとしては、初めての体験です。使う器具も、染色ビン(ドーゼ)や、湿潤箱、免疫組織染色用マーカーペンなど今まで使ったことのないものばかりです。

今回は、比較的簡単なABC法を用いて、皮膚組織中の細胞核に局在しているPCNA(Proliferating cell nuclear antigen)を検出することにしました。サンプルは、自社で販売しているヒト皮膚モデル(TESTSKIN™)のパラフィン包埋切片を用いました。さすが慣れていただけあって、M美さんの手さばきはたいしたもの。あっという間にマイクロームでパラフィンブロックをスライスし、スライドグラス上にパラフィン切片を移し変えてしまいました。



図12
パラフィン切片伸展(左)と洗浄(上)
パラフィン切片は水に浮かべてスライドグラスで掬い取った後、48~50℃のお湯に移して伸展させるのがコツです。
脱パラフィンや洗浄工程は染色瓶を使って行います。

ワンポイントメモ ④ 試薬調製法

内因性ペルオキシダーゼ失活処理液

(0.3%過酸化水素/メタノール溶液) (200ml)

メタノール: 194mlに、10%過酸化水素水: 6mlを加え混合します。
(発熱して危険なので、混合の順番は逆にしないように!)

ブロッキング溶液 (1.5%正常血清/PBS) (10ml)

1×PBS (ー): 10mlに正常血清: 150μlを混合します。

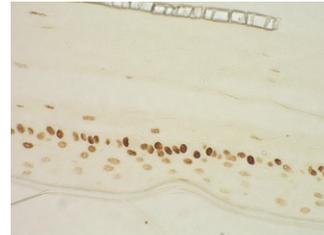
※血清としては、2次(標識)抗体の由来する動物種のものを使用するのが一般的です。

操作フローはプロトコール#4に示す通りですが、A子さんは、慣れない操作にかなり苦戦しています。洗浄した後に残った余分なPBSを、見るに見かねてM美さんが除去してくれました。これはかなり大切な作業のようです。

ABC染色は市販のキットを用いて行いました。図14がその結果です。初めてにしては上出来です。やはり、*Can Get Signal*® immunostainを使用した方がすべての細胞の核が均一に染色されています。さすが、AK先輩が一年近くかけて至適化しただけのことはあります。ちなみに、この試薬は初めて使用する際に、Solution AとSolution Bをそれぞれテストして良い方を選択するような仕様になっています。今回は、Solution Aを使用した方が良好な結果が得られました。*Can Get Signal*® のSolution 1、2とは使用方法が若干異なるので注意が必要です。

A子さんとM美さんは、来週帰国する二人に今回まとめた検討結果を見せくてうずうずしているようです。また、再来週からゴールデンウィークが始まります。A子さんとM美さんは、何やら出かける算段をしているようです。

Can Get Signal® immunostain



従来法(1.5%ウマ血清/PBS)

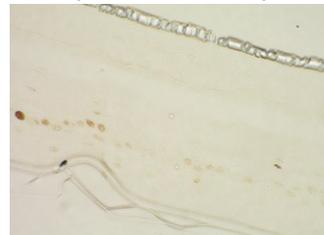


図14 ヒト皮膚モデル中に発現しているPCNAのABC法による検出

サンプル:ヒト皮膚モデル (TESTSKIN™) (東洋紡製)
1次抗体:抗PCNA mouse モノクローナル抗体
2次抗体:ビオチン標識抗mouse IgG抗体
染色:DAB
Can Get Signal® immunostain Solution A使用
ブロッキング:3%ウマ血清/PBS

【プロトコール#4】

Can Get Signal® immunostain を用いるABC法による 免疫組織染色フロー

※反応に用いる抗体の濃度は、推奨濃度からはじめて、減らしてゆく方向で検討します。
また検討は、Solution AとBそれぞれについて行うことをお勧めします。

※サンプルとして固定化組織、凍結切片、および固定化した細胞などを用いることができます。固定化、賦活化等は従来法で行います。

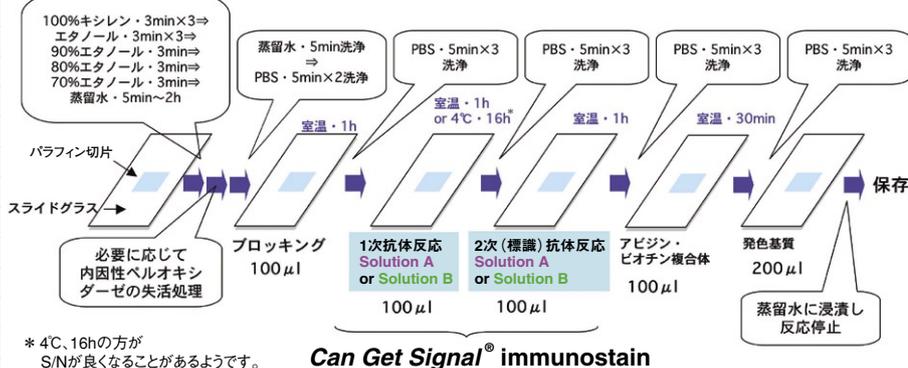


図13

* 4℃、16hの方がS/Nが良くなる場合があります。

Can Get Signal® immunostain

※ほぼ同様の作業で、蛍光免疫染色など、様々な用途に応用可能です。(弊社情報誌UPLOAD Vol 81 p19参照(弊社ホームページでご参照いただけます))

A子さん Can Get Signal[®]、および Can Get Signal[®] immunostainを用いる解析で、抗体の濃度はどのように設定すれば良いですか？

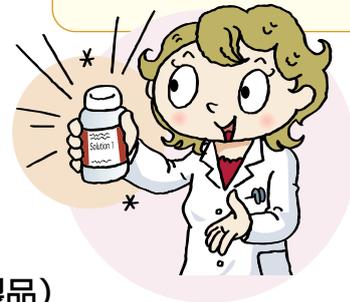
AK先輩 まず現在使用している抗体濃度から始めて、減らしてゆく方向で検討するのがベターです。通常、抗体濃度を落として使用できるので、抗体の節約にもつながります。

A子さん 標識抗体だけで検出する場合は、Can Get Signal[®]のSolution 1と2のどちらを使用したら良いですか？

AK先輩 通常はSolution 2を薦めています。ただ、Solution 1の方が良い場合もあるようなので、最初に比較する方が良いかも知れません。

A子さん Can Get Signal[®] immunostainのSolution AとBはどう使い分ければよいのですか？

AK先輩 この試薬のSolution AとBは、それぞれが1次抗体用、2次(標識)抗体用の両方に対応します。Solution AとBは、反応性が異なるよう設計されています。初めて実験を行うときに、まず両方の試薬が入ったStarter Setを用いてどちらの溶液がより適しているかをテストします。2液を検討することで、より広範に条件検討を行うことができ、成功率を向上させることができます。



製品紹介 (T社バイオ研究所における定番製品)

| 用途 | 品名及び内容 | 包装 | Code No. | 価格 |
|-------------------------------------|--|--------------------|--------------------|--------------------|
| ウェスタンブロッティング ドットブロッティング ELISA | Can Get Signal [®] Immunoreaction Enhancer Solution Solution 1 (for primary antibody) | 各250ml | NKB-101 | ¥30,000 |
| | Solution 2 (for secondary antibody) | 各 50ml | NKB-101T | ¥10,000 |
| | Can Get Signal [®] Solution 1 (for primary antibody) | 250ml | NKB-201 | ¥17,000 |
| | Can Get Signal [®] Solution 2 (for secondary antibody) | 250ml | NKB-301 | ¥17,000 |
| 免疫組織染色 (組織・細胞等) | Can Get Signal [®] immunostain Starter set Solution A & Solution B | 各5ml | NKB-401 | ¥12,000 |
| | Can Get Signal [®] immunostain Solution A | 20ml×1本 20ml×4本 | NKB-501 NKB-502 | ¥30,000 ¥70,000 |
| | Can Get Signal [®] immunostain Solution B | 20ml×1本 20ml×4本 | NKB-601 NKB-602 | ¥30,000 ¥70,000 |
| リン酸化 タンパク質の検出 | Phos-tag [®] biotin BTL-104* | 10mg | NABTL104 | ¥70,000 |
| | Phos-tag [®] biotin BTL-105* | 10mg | NABTL105 | ¥70,000 |
| プレスティンドマーカー (サンプル調製用色素付き) | Sharpline [®] Prestained Low range (17.4~114kDa) | 100~200回 | PMW-201 | ¥13,500 |
| | Sharpline [®] Prestained Broad range (8.6~273kDa) | 100~200回 | PMW-202 | ¥19,500 |
| UVサンプル撮影 白色灯サンプル撮影 | FAS-Ⅲ mini | 一式 | FAS-301 | ¥1,200,000 |
| | FAS-Ⅲ フルシステム | 一式 | FAS-201 | ¥1,400,000 |
| 微弱化学発光撮影 | Lumino Imaging Analyzer FAS-1000 (標準画素CCDタイプ) | 一式 | FAS-1000 | ¥2,500,000 |
| | FAS-1100 (高画素CCDタイプ) | 一式 | FAS-1100 | ¥3,500,000 |

* Phos-tag[®]は広島大学・小池透先生の登録商標です。詳しくは、弊社情報誌UPLOAD Vol. 83 p1-2をご参照ください。BTL-104とBTL-105ではリンカーの長さが異なります。
* 価格は予告なしに変更することがございますので、予めご了承ください。



東洋紡績株式会社



ライフサイエンス事業部(大阪)
〒530-8230 大阪市北区堂島浜二丁目2番8号
TEL 06-6348-3786 FAX 06-6348-3833
(E-mail) order_lifescience@bio.toyobo.co.jp
ライフサイエンス事業部(東京)
〒103-8530 東京都中央区日本橋小網町17番9号
TEL 03-3660-4819 FAX 03-3660-4951
(E-mail) order_lifescience@bio.toyobo.co.jp

Toyoboテクニカルライン
TEL 06-6348-3888
(9:00~12:00 13:00~17:00(土、日、祝を除く))
FAX 06-6348-3833
(E-mail) techosk@bio.toyobo.co.jp
Toyobo Web Site
[http://www.toyobo.co.jp/bio]

取扱店