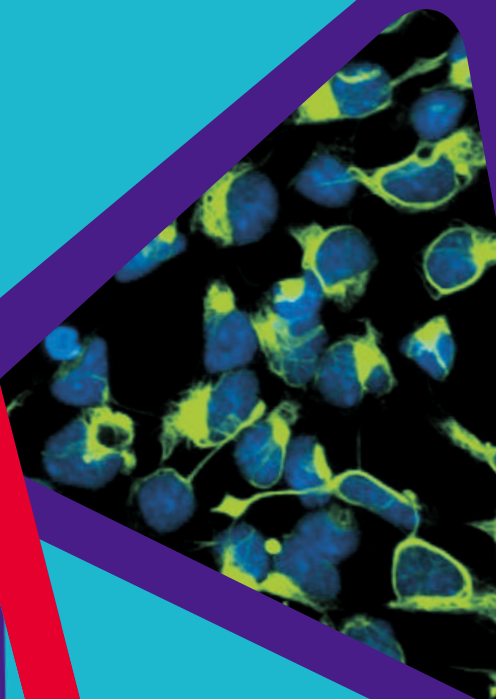
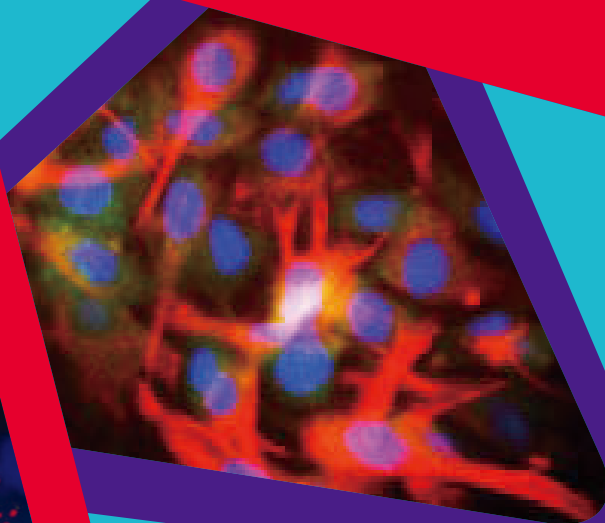
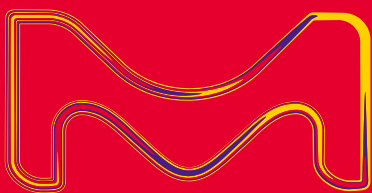


Sigma-Aldrich

抗体ガイドブック

3版



The life science business of Merck operates
as MilliporeSigma in the U.S. and Canada

MERCK

作成者:

Manpreet Mutneja, Ph.D.
Chandra Mohan, Ph.D.
Kevin D. Long, Ph.D.
Chandreyee Das, Ph.D.

協力者:

John L. Hermesman
Robin T. Clark, Ph.D.
Robert Brockett, HTL (ASCP)^{CM}

謝辞:

本ガイドの作成を可能としたマーケティング・コミュニケーションのMary Ann FordとデザインのLiza Bensonの貢献および献身に感謝致します。

メルク株式会社

販売取扱について：カタログ番号を黒で表記している製品の取扱いは**メルク株式会社**、赤で表記している製品の取扱いは**シグマ アルドリッチジャパン合同会社**となります。ご確認のうえ、各社へご注文くださいますようお願い申し上げます。

【製品の技術的なお問い合わせ(テクニカルサービス)】

<メルク製品>	TEL : 03-4531-1140	FAX : 03-5434-4859	Email : bioinfo@merckgroup.com
<シグマ アルドリッチ製品>	TEL : 03-6756-8245	FAX : 03-6756-8302	Email : sialjpts@sial.com

抗体ガイドブック

シグマ アルドリッチ—ライフサイエンス研究におけるあなたのパートナー

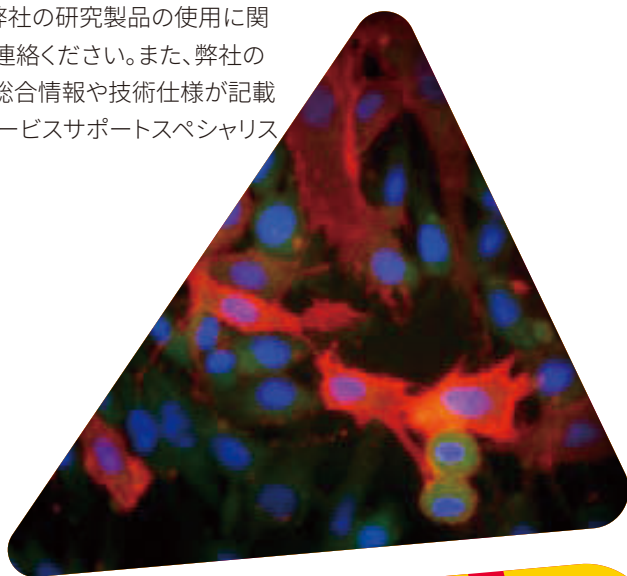
弊社は、科学研究の進歩に積極的に貢献するという目標を基盤としており、今日の研究者が直面する問題や、研究、創薬、発表における研究ツール（抗体、タンパク質、酵素、阻害剤、その他の試薬）の重要性を理解しています。このガイドブックは、ライフサイエンスにおける抗体の理論や実用に関するものであり、研究者に有用な情報や特別なサービスを提供するという弊社の継続的な活動の一部を成しています。

「抗体ガイドブック」には、生物学的研究における抗体の使用や免疫化学技術の主な特長について、簡潔な概要が示されています。この手軽な参考ガイドブックは、文献、一般的な実験手順、各製品のデータシートに記載されている技術を補足するものです。抗体の設計、開発、産生は、弊社の専門分野です。弊社の抗体は厳密に検証されていますが、これは、研究者の間で最も頻繁に引用されている弊社の抗体に対して実施されている包括的な工程のほんの一部に過ぎません（弊社の専門知識に関する詳細については、2ページをご参照ください）。

抗体や実験デザインはそれぞれ異なっていることから、このガイドに記載されている一般的な原則や推奨は、すべての状況に適用可能なものではなく、追加的な情報源とみなす必要があります。常に個々のアッセイを経験的に最適化し、それぞれの抗体のロットについて抗体力価を確立しなければなりません。

あなたが経験豊かな研究者であっても、研究を開始したばかりの初心者であっても、このガイドがあなたの研究に有用となることを願っています。ご提案やご意見などございましたら、いつでもお気軽にお申し付けください。

弊社の製品は、当業界でも最高の製品であり、Sigma-Aldrich®、Chemicon®、Upstate®、Calbiochem® ならびにNovagen®といった製品があります。8万以上の抗体やキットを含む弊社の研究製品の使用に関する情報や、様々な免疫学的応用に関する科学的助言については、弊社にご連絡ください。また、弊社のウェブサイト<http://www.sigmaaldrich.com/japan.html/> にも、広範な総合情報や技術仕様が記載されています。弊社の高度なトレーニングを受けた最高のカスタマー・技術サービスサポートスペシャリストが、いつでもあなたの研究をサポート致しますので、どうぞご安心ください。

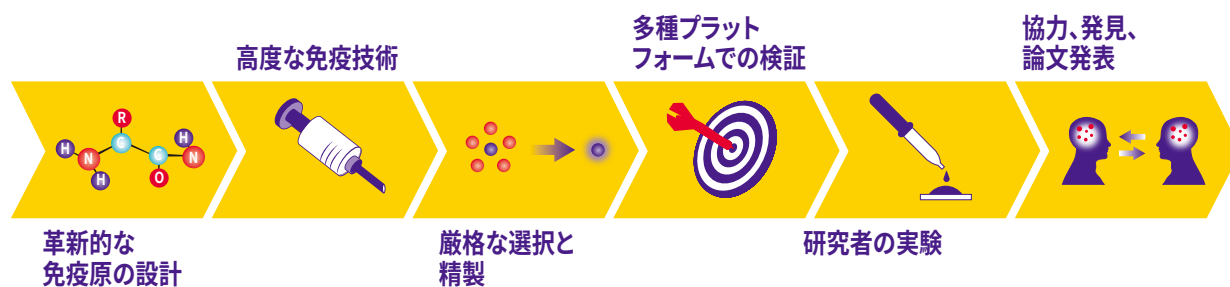


抗体の品質についてぜひ知っておいていただきたいこと

抗体は、その特異性によって機能が定まっているため、確実性や使いやすさを意味する、高い品質を備えていなければならないと思われることが多いようです。実際には、高品質が特異性や使いやすさを意味することはほとんどありません。抗体による特定のアミノ酸配列や立体構造への結合は、理論的にモデル化し、予測することはできますが、何十年もの使用経験によって、抗原性や免疫原配列の特異性、抗体濃度、バッファー、免疫化やサンプル調製技術などの要因が、交差反応性や非特異的結合などの問題に大きく寄与することが明らかになっています。

研究者がタンパク質プローブとして抗体を使用し始めた1970年代初期から、抗体の性能が一定ではないという問題が研究者たちを悩ませています。抗体開発および使用の先駆者らは、免疫学についてかなり広範な知識を有していました。現在の研究活動では、精製から細胞機能の阻害まで、驚くほど多様なアプリケーションにおいて抗体が用いられています。今日、抗体の使用者は、古典的な医学解剖学者から、研究を始めたばかりの生化学者や生物医学エンジニアにわたっています。多くの使用者には知られていませんが、免疫原の設計は非常に複雑であり、高品質な抗体の産生に重要な、免疫原性はあまり高くないものの、特異性の高いペプチドを使用するために十分に頑強なプロトコルは、特定の一般的ではない免疫化プロトコル以外にはありません。

弊社は、革新的な免疫原の設計、免疫化、選択、スクリーニング、検証において、何十年もの経験を有しており、Sigma-Aldrich®、Chemicon®、Upstate®、Millipore®、Calbiochem®、Novagen®を組み合わせた強みに基づき、多数の頻繁に引用されている抗体を作製しています。高品質な抗体の製造は、技術革新のみならず、販売前にお客様によるβテストを実施したり、設計・エンジニアリングチームにフィードバックを提供したりすることによって調整されています。このような努力や協力が、新しい検証技術や、改善されたマルチプレックス分析、高解像度フローサイトメトリーなどの新規の抗体ベースのテクノロジーの開発につながっています。設計の熟考からフィールドでの使用や報告に至るこのサイクルが、品質の基盤となっています。技術的および科学的背景に基づき、弊社は、単なる販売業者に留まらず、高品質な抗体の主要な設計者かつ生産者となっています。実際に、弊社の抗体の各バイアルには、たくさんの科学が詰め込まれているのです。



シグマ アルドリッチの抗体を支える科学

抗原の開発および免疫化

弊社の抗体研究チームは、最も有用な標的や抗体を検出するため、最新の出版物を常に監視・調査し、最先端の研究機関と協力しています。弊社では、翻訳後修飾、構造、交差反応性、相同性などを考慮し、複数の免疫原を設計しています。神経科学、癌、エピジェネティクス、シグナル伝達研究などの主要な研究分野の先導者と共に標的の選択について協議し、これらの研究者の専門知識を用いて開発や検証の方向性を決定しています。

モノクローナル抗体の開発

弊社のUSDA(米国農務省)認定施設における免疫化の後、最先端の工程によって、モノクローナル抗体やポリクローナル抗体が産生されます。モノクローナル抗体には、ハイブリドーマの融合やフィーディングに関するすべてのステップを実施するロボットのクローニング・スクリーニングシステムを用いています。これらの高度に自動化された工程では、最適な作業量や最高の均一性を保証するため、最先端のテクノロジーが用いられています。アレイ・ジェット自動マイクロアレイシステムを用い、融合物を検査し、陽性のクローンを検出します。陽性のシグナルが抗体によるものであることを確認するために、再度ELISAを用いてスクリーニングを実施します。陽性例を、抗原を内在的に発現している細胞の自動ウェスタンブロットによってスクリーニングします。サンプルのクローン性が100%になるまで、プールした陽性例を繰り返し希釈し、最も性能が優れているものを分離します。この追加的な工程が、弊社が競合から抜き出ている理由の一つとなっています。追加的なウェスタンブロットによって、その後の検証に際して可能な限り最良なクローンを選択することができます。

ポリクローナル抗体の開発

ポリクローナル抗体は、高速タンパク質液体クロマトグラフィー (FPLC) システムによって精製します。1本のカラムを10回以上用いることはありません。さらなる精製ステップの判定には、自動ウェスタンブロットが用いられています。このように作製された新しいポリクローナル抗体は、多数のアプリケーションにおいて検証され、弊社のタンパク質および細胞分析プラットフォームのキットやアッセイにも組み入れられます。

特別な検証

複数のステップからなる複数のアプリケーションに向けた検証工程をサポートするため、弊社では、1,300種類以上の細胞溶解液を含む組織およびプロットのライブラリを有しており、それぞれの抗体の特異性を正確に判定することが可能となっています。弊社には、社内に完全な細胞解析テクノロジー開発チームが設置されているという利点があり

ます。フローサイトメトリーに関しては、弊社のGuava easyCyte™ flow cytometerを用いて抗体を検証しています。同様に、社内のビーズベースの免疫学的検出チームが、信頼性の高いLuminex xMAPプラットフォームを用いて抗体を検証する手助けをしています。弊社のマイクロアレイシステムは、主に修飾ヒストンを認識する抗体の開発・検証を扱っています。共焦点顕微鏡やハイスループットIHC装置を用いることによって、手動イメージングよりも迅速に正確なデータを得ることができます。さらなる科学的調査によって、染色パターンが、発表されている細胞内発現と一致しているかどうかが明らかになります。免疫組織化学に関しては、シグナルを確認するために陰性コントロールを用いています。

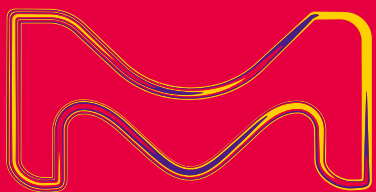
テクニカルレビュー

弊社の工程の最終ステップは、独立した研究者チームによって実施される品質確認です。抗体の製造を開始する前に、このチームがすべての抗体の検証データ、ならびにβテストに参加した研究者によるデータの検討を行います。抗体が、弊社の厳格な規格を満たしていない場合は、例えば当初の目的が達成されているとしても、例外なく廃棄されます。弊社の品質工程に不可欠な構成要素として、この厳密なレビューに合格した抗体のみがお客様に提供されることとなります。

お客様による実験および協力

製造および販売の開始後は、テクニカルサポートサイエンティストやフィールドエンジニアからなる高度に専門化されたチームによって、お客様の研究活動を支援しています。研究者と密接に連携し、免疫原の設計や抗体の性能を改善します。弊社には、継続的に検証を実施するため、βテストを実施する研究者のネットワークがあります。すべての抗体は、抗体の性能を100%保証する弊社のポリシーによってサポートされています。

現在市販されている中でも、弊社の抗体は、頻繁に引用されており、信頼性が高く、高度に検証済みの抗体となっています。これらの抗体の品質は、その始まりから、製造、生産、および販売を通し、実験室や作業台に至るまで、高度に維持されています。開始から完了まで、弊社の抗体の各チューブにこめられた科学の力が、世界で最も確実な、頑健で、かつ発表しやすい抗体の性能への信頼を保証します。



contents

抗体の品質についてぜひ知っておいていただきたいこと

1

抗体に関する理論 ページ7

1.1	抗体の紹介	7
1.2	抗原	7
1.3	エピトープ	8
1.4	抗体	9
1.5	抗体 - 抗原相互作用	12
1.6	抗原 - 抗体結合の性質	13
1.7	抗原 - 抗体反応に影響を及ぼす要因	13
1.8	抗体の産生	14
1.9	抗体のフォーマット	16
1.10	抗体の生物学的作用	17

2

抗体の実用 ページ21

2.1	選択および使用	21
2.2	抗体の力価および濃度	22
2.3	抗体の保存および取り扱い	22
2.4	標識抗体	23
2.5	二次抗体の使用	24
2.6	適切なコントロール	25
2.7	抗体を用いた論文発表	25
2.8	抗体の検証	26

3

抗体の応用 ページ29

3.1	抗体の応用の紹介	29
3.2	免疫沈降法	30
3.3	クロマチン免疫沈降法 (ChIP)	34
3.4	ウェスタンブロット	42
3.5	酵素結合免疫吸着検査法 (ELISA)	51
3.6	マルチプレックスビーズベース解析	56
3.7	免疫組織化学／免疫細胞化学	60
3.8	フローサイトメトリー	69
3.9	機能阻害および刺激アッセイ	77

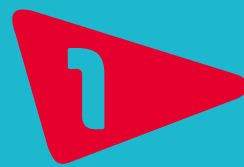
4

プロトコルの例 ページ81

4.1	免疫沈降法	81
4.2	クロマチン免疫沈降法 (ChIP)	81
4.3	ウェスタンブロット	83
4.4	酵素結合免疫吸着検査法 (ELISA)	85
4.5	マルチプレックスビーズベース検出	86
4.6	免疫組織化学／免疫細胞化学	87
4.7	フローサイトメトリー	88
4.8	機能的阻害および刺激アッセイ	89

付録	91
----	----

用語集	93
-----	----



抗体に関する 理論

- 1.1 抗体の紹介
- 1.2 抗原
- 1.3 エピトープ
- 1.4 抗体
- 1.5 抗体 - 抗原相互作用
- 1.6 抗原 - 抗体結合の性質
- 1.7 抗原 - 抗体反応に影響を
及ぼす要因
- 1.8 抗体の産生
- 1.9 抗体のフォーマット
- 1.10 抗体の生物学的作用

1.1 抗体の紹介

20世紀の最初の50年間に、一連の科学的発見によって、抗体が媒介する免疫が特定の免疫反応の礎石を成していることが明らかになりました。1970年代初期に初めて免疫標識の研究ツールとして用いられて以来、抗体技術は大きく改善され、ライフサイエンス研究のほとんどの分野にお

いて必要不可欠なツールとなっています。すべての免疫化学技術の基本原理は、特異的な抗体が特定の抗原と結合し、ユニークな組み合わせの抗原抗対複合体を形成するということです。以下において、この結合の性質や、この頑強かつ特異的な結合を、研究のための分子的標識として使用する方法について説明します。

1.2 抗原

抗原 (antigen) という用語は、抗体産生 (antibody generation) に由来しており、免疫反応 (例、特異抗体分子の産生) を誘発する能力を有するすべての物質を指します。定義上、抗原 (Ag) は、その抗原の存在によって形成された特異抗体に結合する能力を有しています。

一般的に、抗原は異種タンパク質またはその断片であり、感染によってホストの体内に侵入します。しかし、場合によっては、身体自身のタンパク質が抗原として作用し、自己免疫反応を誘発することもあります。細菌やウイルスは、表面か内部に抗原を有しており、これらの抗原を分離し、ワクチンの開発に用いることができます。

抗原は、一般的に分子量が高く、通常はタンパク質または多糖類です。ポリペプチド、脂質、核酸、そして多数のその他の材質も、抗原として機能することがあります。ハプテンと呼ばれる小さな物質が、ウシ血清アルブミン、キーホールリンペットヘモシアニン (KLH)、またはその他の合成マトリックスなどのより大きなキャリアタンパク質と化学的に結合している場合は、これらに対しても免疫反応が誘発されることがあります。

薬剤、単糖、アミノ酸、低分子ペプチド、リン脂質、またはトリグリセリドなどの多様な分子が、ハプテンとして機能する場合があります。このように、十分な時間をかければ、すべてのあらゆる異物が免疫系によって特定され、特異抗体の産生を誘発し得るのです。しかし、この特異的な免疫反応は非常に可変的で、抗原のサイズ、構造、組成に大きく依存しています。タンパク質または糖タンパク質は、強力な免疫反応を誘発する能力を有しており、言い換えると、免疫原性が高いため、最も適した抗原とみなされています。

抗原は、(1) B細胞およびその表面抗体 (sIgM)、および(2) T細胞上のT細胞受容体の2種類の異なる工程によってホストに認識されます。B細胞もT細胞も同じ抗原に反応しますが、反応するのは同じ分子の別々の部分です。B細胞の表面にある抗体は、タンパク質の立体構造を認識することができます。一方、T細胞では、抗原が抗原提示細胞によって取り込まれ、認識可能なフラグメントに分解される必要があります。一般的な抗原提示細胞は、マクロファージや樹状細胞です。免疫反応を図1に表します。生体内で起こる抗体産生の詳細については、適切な免疫学の教科書を参照してください。

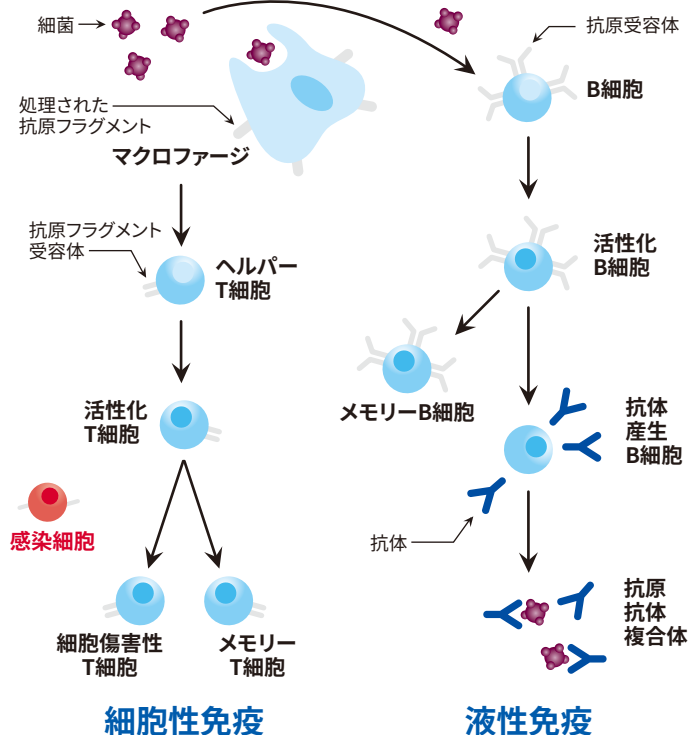


図 1.
免疫反応

1.3 エピトープ

抗原には、相補的な抗体が特異的に結合する小さな部位があり、これはエピトープまたは抗原決定基と呼ばれています。エピトープは、通常抗原の表面にある1～6個の単糖、または5～8個のアミノ酸残基からなっています。抗原分子は3次元に存在しているため、抗体によって認識されるエピトープは、抗原の特定の3次元立体構造の存在に依存している場合があります。例えば、2つの天然タンパク質のループまたはサブユニットの相互作用によって形成されるユニークな部位が挙げられます。これは構造的エピトープ（不連続エピトープ）として知られています。エピトープは、単純な直鎖状アミノ酸配列である場合もあり、このようなエピトープは線状エピトープ（連続エピトープ）として知られています。

標的分子（抗原）上の潜在的な結合部位は多岐にわたり、そのそれぞれが、共有結合、イオン結合、親水性および疎水性相互作用によって、独自の構造的特性を有しています。実際、これが抗体の選択や性能に重大な影響を及ぼします。標的抗原と抗体の間に効率的な相互作用を生じさせるためには、エピトープが容易に結合可能でなければなりません。

標的分子が、固定、還元、pH変化によって、またはゲル電気泳動の前処理中に変性してしまった場合には、エピトープ

優れた抗原の特性

- 分子内に構造的安定性および化学的複雑性を有する領域がある
- 相当な長さがあるが、大規模な反復単位がない
- 分子量が最小でも8,000～10,000 Daである（ただし、キャリアタンパク質の存在下では、200 Da程度の分子量しかないハプテンも用いられる）
- 免疫系によって処理可能である
- 抗体形成機構が到達可能な免疫原性領域がある
- ホスト内に存在するものとは十分に異なった構造エレメントがある
- ペプチド抗原の場合、K、R、E、D、Q、Nの免疫原性アミノ酸を30%以上含有する領域がある
- ペプチド抗原の場合、親水性の、または帯電したアミノ酸残基がある

が変化し、抗体と相互作用する能力に影響が及ぶこともあります。例として、一部の抗体はウェスタンブロット（WB）では機能しませんが、免疫組織化学（IHC）には適しています。これは、IHCの手順では複雑な抗原部位が組織中で維持される可能性があるのに対し、WBではサンプル調製の工程によってタンパク質の立体構造が変化し、抗原部位が破壊され、抗体と結合できなくなってしまうためです。

変性タンパク質では、線状エピトープ以外は認識されない場合があります。したがって、ウェスタンブロットなどの変性タンパク質を用いるプロトコルでは、線状エピトープを認識する抗体が選択されます。エピトープは、折り畳まれたタンパク質の内部にある場合もあります。このようなエピ

注意

非常に重要な標的の1つである $\alpha\beta3$ インテグリンは、 αV および $\beta3$ サブユニットが近位に関連することによってエピトープが形成されていますが、この立体構造は電気泳動のプロトコルでは損なわれてしまうため、ウェスタンブロット実験では検出できません。

トープは、免疫沈降法などの変性を伴わないプロトコルでは、抗体に接近することができません。定義上、立体構造エピトープは、折り畳まれたタンパク質の外側にあります。立体構造エピトープを認識する抗体は、免疫沈降法またはフローサイトメトリーなどの、穏やかで変性を伴わない手順に適しています。

理想的には、通常折り畳まれているタンパク質の表面にある線状エピトープを認識する抗体であれば、変性を伴うプロトコルでも伴わないプロトコルでも良好に機能します。

このように、エピトープは、抗原の自然な細胞環境において存在している場合もあれば、変性後においてのみ露出される場合もあります。自然な形態において、抗原は細胞質性(可溶性)、膜結合性、または分泌性である場合があります。エピトープの数、位置、サイズは、抗体の産生工程において、どの程度の抗原が提示されるかによります。

標的タンパク質、抗体によって認識されるエピトープ、配列保存性、技術的原則に関する知識は、抗体やプロトコルの選択に役立ちます。実際のエピトープマッピングまたは配列データは、有用ではありますが、抗体の特異性を確定するために必要なわけではありません(第2.7章、抗体を用いた論文発表参照)。

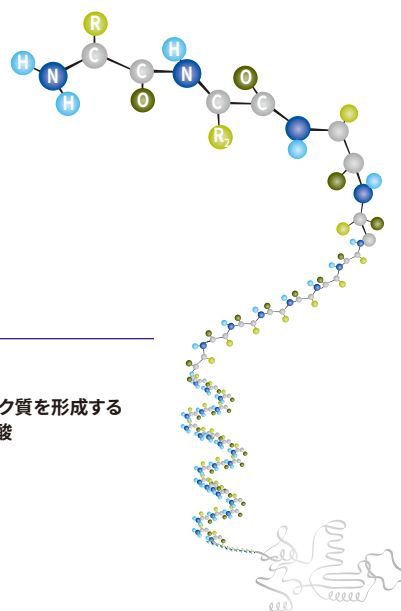


図 2.
タンパク質を形成する
アミノ酸

1.4 抗体

抗体は、「感受性のある動物において抗体の産生を引き起こした抗原と特異的に結合することが可能な免疫グロブリン」として定義されています。抗体は、外来性の分子による体内への侵入に反応して産生されます。抗体はAbと略され、通常は免疫グロブリンまたはIgと呼ばれます。ヒト免疫グロブリンは、構造および機能的に類似した糖タンパク質(タンパク質82~96%、糖質4~18%)のグループで、液性免疫に寄与しています。

構造

抗体は、4本のポリペプチド鎖からなるY字型のユニットで、1つ以上のコピーとして存在しています。それぞれのY字には、同一な重鎖のコピーが2本、同一な軽鎖のコピーが2本あります。重鎖と軽鎖は、それぞれの相対的な分子量によって命名されたものです。このY字型のユニットは、実際の抗原への結合に重要な2本の可変性の抗原特異的なF(ab)アーム、免疫細胞のFc受容体に結合する領域で、ほとんどの免疫化学手順において抗体を操作するときには有用な「ハンドル」として用いられる定常Fc「テイル」からなっています。抗体のF(ab)領域の数は、抗体のサブクラス(下記参照)と対応しており、抗体の結合価(抗原に結合可能な抗体の「アーム」の数)を決定しています。

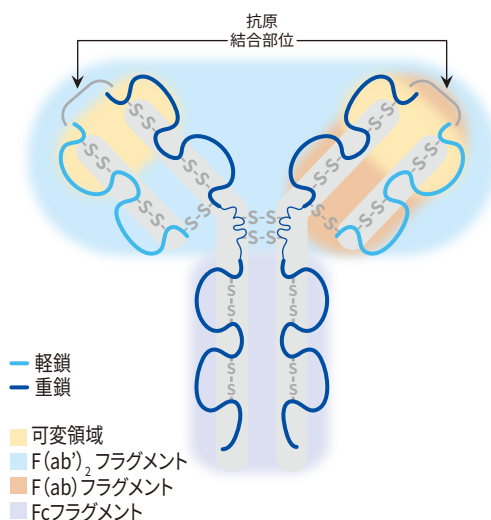


図 3.
抗体の構造

これらの3つの領域は、タンパク質分解性酵素、パパインによって2つのF(ab)フラグメントと1つのFcフラグメントに、またはペプシンによってヒンジ領域で1つのF(ab')₂フラグメントと1つのFcフラグメントに切断することができます。F(ab)フラグメントは抗原を沈降させず、Fc領域がないことから、*in vivo*試験において免疫細胞によって結合されないため、IgG抗体の断片化は有用である場合もあります。



ご存知ですか？

直接標識抗体では、Fc領域が酵素または蛍光プローブによって標識されています。Fc領域は、ELISAにおいて抗体をプレートに固定させる領域で、免疫沈降法、免疫プロット法、免疫組織化学において、二次抗体によって認識される領域でもあります。

F(ab)フラグメントはFc領域がないため、サイズが小さく、架橋しないことから機能的試験に用いるために標識されることがよくあります。興味深いことに、Fcフラグメントは、組織化学染色のブロッキング剤として頻繁に用いられています。

サブクラス

抗体は、Y字型ユニットの数や重鎖の種類に基づき、IgG、IgM、IgA、IgD、IgEの5つのクラスに分けられています。IgG、IgM、IgA、IgD、およびIgEの重鎖は、それぞれ γ 、 μ 、 α 、 δ 、および ϵ として知られています。抗体の軽鎖は、(ポリペプチド構造のわずかな差異によって)カプパ(κ)またはラムダ(λ)型のいずれかに分類することができますが、抗体のサブクラスは重鎖によって決まります。

抗体のサブクラスによって、ジスルフィド結合の数や、ヒンジ領域の長さが異なります。免疫化学法において最も一般的に用いられている抗体は、IgGクラスの抗体であり、これは、IgGが血清中に放出される主要な免疫グロブリンであるためです。

表 1: 免疫グロブリンのサブクラス

クラス/ (サブクラス)	重鎖	軽鎖	MW (kDa)	構造	機能
IgA1 IgA2	$\alpha 1$ $\alpha 2$	λ または κ	150～ 600	単量体～四量体	最も多く産生されているIg; 粘膜表面を保護; 断片化処理に耐性あり; 乳中に分泌される
IgD	δ	λ または κ	150	単量体	機能不明; B細胞の発生においてIgMと共に作用; 主にB細胞に結合している
IgE	ϵ	λ または κ	190	単量体	寄生物に対する防御; アレルギー反応を引き起こす
IgG ₁ IgG _{2a} IgG _{2b} IgG ₃ IgG ₄	$\gamma 1$ $\gamma 2$ $\gamma 2$ $\gamma 3$ $\gamma 4$	λ または κ	150	単量体	血清中における主なIg; オプソニン化に優れている; 中程度の補体結合作用を有する (IgG ₃); 胎盤透過性あり
IgM	μ	λ または κ	900	五量体	一次反応抗体; 強力な補体結合作用を有する; オプソニン化に優れている

IgA

血中で、IgAは単量体として低レベルで存在しています。IgAは、二量体として認められる粘膜表面で最も活性が高く、粘膜表面の一次防御を担っています。粘膜内層では、その他のすべての種類の抗体を合わせたよりも多くのIgAが産生されています。IgAの主な機能は、中和抗体としての作用です。唾液、涙、母乳には、IgAが高レベルで認められます。ヒトでは2種類のIgAのサブタイプが知られていますが、マウスでは1種類しか報告されていません。IgA1は、血清中の総IgAの最大85%を占めていると考えられています。選択的IgA欠損症は、易感染性を増大させる最も一般的な免疫不全疾患の1つです。IgA欠損症は、自己免疫疾患やアレルギー疾患を有する患者においてよく認められます。IgAの半減期は約5日です。

IgD

2つのエпитープ結合部位を有する単量体の抗体であり、ほとんどのBリンパ球の表面において認められます。IgDの正確な機能については未だに議論されていますが、B細胞の活性化に必要な抗原受容体として作用するのではないかと考えられています。IgDは、好塩基球や肥満細胞に結合して活性化させ、抗菌因子の産生を誘導することも報告されています。また、自己反応性の自己抗体を産生するBリンパ球の除去においても役割を担っていると考えられています。IgDは、血清中で少量認められる分泌型としても産生されており、分泌型は、 δ クラスの2本の重鎖と2本の軽鎖からなっています。IgDの半減期は約3日です。

IgE

このグループの抗体は、粘膜表面、血液、および組織において機能しています。IgEは、2本の重鎖(ϵ 鎖)と2本の軽鎖からなる単量体として存在しています。 ϵ 鎖には、4つの免疫グロブリン様定常ドメインがあります。血清中には低濃度で存在し、血清中のすべての抗体の約0.002%にしか値しません。ほとんどのIgEは、Fc領域を介して、肥満細胞や好塩基球上のIgE受容体に堅固に結合しています。IgEは、過敏症反応において重要な役割を担っており、IgEの産生はサイトカインによって厳密に制御されています。IgEの半減期は約2日です。

IgG

IgGは、血中で最も豊富に認められる抗体のクラスで、血清中のすべての抗体の最大80%を占めています。IgGは単量体として認められます。存在量によって4種類のIgGのサブクラスがあり ($\text{IgG}_1 > \text{IgG}_2 > \text{IgG}_3 > \text{IgG}_4$)、どのサブクラスが産生されるかは、存在するサイトカインの種類によります。IgG₁およびIgG₃は、食細胞のFc受容体に高い親和性を示しますが、IgG₂のFc受容体への親和性は非常に低く、IgG₄の親和性は中程度です。IgGは、循環器系から出て組織に侵入することができます。IgG₁、IgG₃、およびIgG₄は、胎盤関門を通過することができ、新生児に保護を供します。IgGは補体系の活性化に効果を有し、食細胞のFc受容体を用いたオプソニン化に非常に有効です。Fc領域を介して、IgGはナチュラルキラー細胞にも結合することができ、抗体依存性の細胞毒性に寄与します。IgGの半減期は、サブクラスによって異なり7~23日にわたります。

IgM

このクラスの免疫グロブリンは、感染に反応して産生される最初の免疫グロブリンであり、B細胞の膜上において、または形質細胞によって分泌される5つのサブユニットからなる高分子として認められます。IgMは、新生児が最初に合成する免疫グロブリンでもあります。細胞膜結合型IgMと分泌型では、Fc領域が異なります。膜結合型IgMは、Fc受容体ではなく、内在性膜タンパク質として直接的に細胞膜上に存在します。分泌型IgMは五量体分子であり、複数の免疫グロブリンがジスルフィド結合によって共有結合的に接合しています。この構造によって複数の結合部位が供されています。各単量体は、2本の軽鎖 (κ または λ のいずれか)と2本の重鎖からなっています。五量体であるため、IgMは補体の活性化や凝集の誘発に特に適しています。IgMの半減期は約5日です。

ご存知ですか？

収斂進化の美しい例として、軟骨魚類およびラクダ科の哺乳類の重鎖抗体が知られています。これらの動物は、軽鎖と重鎖の抗体に加え、重鎖のみの抗体も有しており、サイズが小さいことから研究ツールとして活用されています。

IgNAR

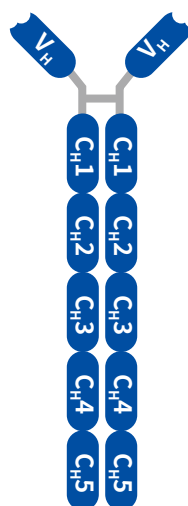
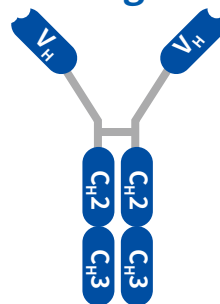


図 4.

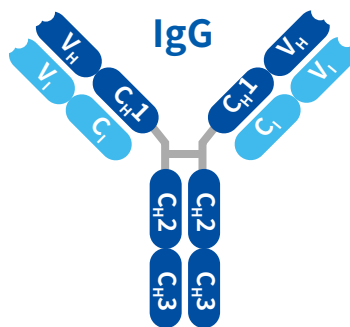
重鎖のみの抗体

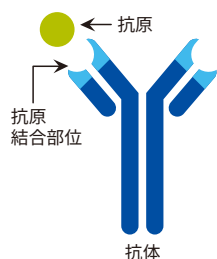
サメの重鎖抗体 (IgNAR) およびラクダ科の重鎖抗体 (hIgG) と、一般的な抗体 (IgG) の比較。重鎖は青色で、軽鎖は水色で表されています。

hIgG



IgG





1.5 抗体 - 抗原相互作用

抗原や抗体について理解したところで、抗原と抗体の相互作用について考えてみましょう。抗体と、抗原の1つの抗原部位との相互作用の強度は、抗原に対する抗体の親和性として表すことができます。各抗原部位では、抗体の「アーム」の変領域が、弱い非共有結合的な力によって、抗原の多数の部位と相互作用します。相互作用が大きいほど、親和性も高くなります。抗原抗体複合体の全体的な安定性または強度に関しては、結合活性の方が、情報価値が高いかもしれません。親和性は、エピトープに対する抗体の親和性、抗原と抗体の両方の結合価、および相互作用する部位の立体配置という主に3つの要因によって制御されています。究極的には、これらの要因が、抗体の特異性、すなわち特定の抗体が的確な抗原のエピトープに結合する可能性を定めているのです。

交差反応性とは、抗体または抗体の集団が、その他の抗原のエピトープに結合することを指します。これは、抗体の結合活性または特異性が低いことによって、または複数の異なる抗原が同一のまたは非常に類似したエピトープを有しているために起こります。関連するグループの抗原に対する全般的な結合が求められる場合、または進化において抗原のエピトープのタンパク質配列が高度に保存されていない場合に種間標識を試みる場合には、交差反応性が望ましいこともあります。交差反応性によって、抗原濃度が過剰または過少評価される場合があります、これはイムノアッセイでは問題となります。

免疫化学技術は、混入分子が高レベルで存在する場合においても、各免疫グロブリンがそれぞれの抗原に対して分子レベルで示す極度の特異性の上に成り立っています。ほとんどの抗原や抗体は複数の相互作用部位を有している

ため、相互作用を介して沈殿物を形成することができません。抗体を使用する実験の例には、ウェスタンブロット、免疫組織化学および免疫細胞化学、酵素結合免疫吸着検査法 (ELISA)、免疫沈降法、フローサイトメトリーがあります。それぞれについては、本ガイドの後述の章において詳細に説明します。

抗体 - 抗原相互作用の動態学

抗原と抗体の特異的な結合は、水素結合、疎水性相互作用、静電力、ファン・デル・ワールス力によるものです。これらの力は弱く、非共有結合的ですが、抗原と抗体の結合は非常に強力である場合もあります。抗体と同様に、抗原も、同一のエピトープのコピーが複数ある場合や、複数の抗体によって認識される複数のエピトープがある場合など、相互作用する部位を複数有していることがあります。複数の相互作用部位が関与する結合では、より安定した複合体が形成されますが、立体構造上の干渉が生じ、結合の可能性が低下することもあります。すべての抗原 - 抗体結合は可逆性であり、あらゆる可逆性の二分子相互作用に適用される基本的な熱力学的原理に従っています。

$$K_A = \frac{[Ab-Ag]}{[Ab][Ag]}$$

ここで、 K_A は親和定数、 $[Ab-Ag]$ は抗原抗体複合体のモル濃度、 $[Ab]$ および $[Ag]$ はそれぞれ抗体 (Ab) または抗原 (Ag) における相互作用をしていないフリーの結合部位のモル濃度です。

平衡状態に至るまでに要する時間は、拡散率や、抗体の抗原に対する親和性に依存しており、大きく異なる場合があります。抗体 - 抗原結合の親和定数も広範囲にわたる場合がありますが、 10^5 /モル未満から 10^{12} /モル超に及びます。親和定数は、温度、pH、溶媒の影響を受けます。モノクローナル抗体については親和定数を求めることができますが、ポリクローナル抗体と抗原の間には複数の結合が形成されるため、ポリクローナル抗体の親和定数を求めることはできません。抗体の抗原に対する親和性の定量測定は、平衡透析によって実施することができます。抗体濃度を一定とし、リガンドの濃度を変えながら平衡透析を繰り返すことにより、Scatchardプロットを作成します。このプロットから、親和性や潜在的な交差反応性に関する情報が得られます。

ご存知ですか？

ショウジョウバエ、アフリカツメガエル、ゼブラフィッシュ、およびその他の非哺乳類の生物モデルを用いて研究を実施している研究者は、哺乳類でしか検証されていない抗体に直面することがしばしばあります。融合タンパク質全体、またはより大きな保存された免疫原配列に対して産生されたポリクローナル抗体を選択することにより、種間の交差反応性の可能性が高くなります。

モノクローナル抗体とポリクローナル抗体の差異は、それぞれの使用の利点や欠点の基盤を成しているため、実

験手順を設計する場合には、モノクローナル抗体とポリクローナル抗体を区別することが重要です。

1.6 抗原 - 抗体結合の性質

抗体の結合部位は、抗体分子のF(ab)部分に位置しており、重鎖と軽鎖の超可変領域によって構築されています。この部位と抗原の結合の特徴や工程は以下のとおりです：

- 抗原と抗体の結合部位の接合は非共有結合性であるため、本質的に可逆的です。
- これらの結合は、水素結合、静電力結合、またはファン・デル・ワールス力によるものです。
- 通常は複数の結合の形成が認められ、抗体と抗原の間に比較的緊密な結合が生じています。
- 細胞の抗原決定基(エпитープとして知られています)と、抗体の抗原結合部位(パラトープ)の間の特異的結合に関与する部位は、これらの分子の非常に小さな部位

で、通常はほんの少数のアミノ酸からなっています。

- 特異的結合のためには2分子間の反発を克服しなければならぬことから、これらの部位は抗原 - 抗体反応において重大な意味を有します。
- エピトープがパラトープと接触する際、まずはイオンおよび疎水性力によって互いに引き寄せられます。
- これらの力が水和エネルギーを乗り越える助けとなり、エピトープとパラトープが互いに接近するにつれて水分子が排除されます。
- この誘引は、その後ファン・デル・ワールス力が加わることによってさらに強力になり、エピトープとパラトープをさらに接近させます。

1.7 抗原 - 抗体反応に影響を及ぼす要因

抗原抗体反応は、複数の要因の影響を受ける場合があります。一般的な要因は次のとおりです：

温度

抗原 - 抗体反応に最適な温度は、エピトープやパラトープの化学的性質や、これらの相互作用に関わる結合の種類によります。例として、水素結合の形成は発熱性である傾向にあります。これらの結合は温度が低いほど安定するため、炭水化物抗原を用いる場合には温度が重要となる場合があります。

pH

抗原抗体複合体の平衡定数に対するpHの影響は、pHが6.5から8.4の場合に生じます。pH 6.5未満およびpH 8.4超では、抗原 - 抗体反応が強力に阻害されます。pH 5.0また

は9.5では、平衡定数がpH 6.5～7.0における値よりも100倍小さい値となります。極端なpH条件下では、抗体の立体構造変化が起こり、抗原との相補性が損なわれる場合があります。

イオン強度

イオン強度による抗原 - 抗体反応への影響は、血液型血清学において特に重要であり、ナトリウムイオンや塩化物イオンは、反応に著しい影響を及ぼします。例として、通常生理食塩水では、 Na^+ と Cl^- が複合体の周囲に群がり、部分的に電荷を中和するので、抗体による抗原への結合に干渉する可能性があります。これは、低親和性の抗体を用いる場合には、問題となる可能性があります。 γ -グロブリンは、極度の低イオン強度に曝露すると凝集し、赤血球のリポタンパク質と可逆性の複合体を形成し、沈降することが良く知られています。



ご存知ですか？

プロゾーン効果は、サンプル中の抗原または抗体が過剰なために分析対象が検出用分子に結合できず、抗原抗体反応の結果が偽陰性または偽低値となる現象です。

典型的なイムノアッセイでは、抗原と抗体が結合し、検出・測定可能な複合体を形成します。しかし、プロゾーン効果が起こると、過剰な抗原または抗体がすべての抗原抗体反応-検出のための分子に結合してしまい、利用可能な検出用分子が残りません。このため、抗原抗体複合体が検出されず、偽陰性あるいは実際の抗原濃度よりも低い推定値となります。偽陰性とは気付かれない場合もあり、臨床では、これが誤診につながる恐れもあります。結果の誤りが疑われる場合には、必ずサンプルを希釈し、再検査を実施する必要があります。

1.8 抗体の産生

ポリクローナルおよびモノクローナル抗体

抗体は、免疫系の一部であるB細胞によって、感染性病原体などの異物による動物の体内への侵入に応答して産生されます。抗体は、抗体の産生を引き起こした抗原に結合し、抗原が破壊されるようにフラグを付け、感染症と闘う手助けをします。動物の体に備わったこの能力を用いて、特定の分子に結合する抗体を産生することができます。標的的特異的な抗体は、対象となる分子を分離し、検出するために用いることができます。抗体は、ライフサイエンス研究において最も重要なツールの1つとなっており、タンパク質やその他の分子の検出、定量化、経時的な変化やその他の影響による変化の判定などを可能としています。

免疫化学技術において用いられている抗体の多くは、ウサギ、ヤギ、ロバ、ヒツジなどの適切な動物に、対象となる抗原を繰り返し接種することによって産生されます。抗体の産生がピークに達した時点で、血清を回収します。この方法では、血清1 mLあたり約1~10 mgの特異的IgG抗体濃度を得ることができます。抗原性が弱い物質では、抗原の放出を遅らせ、マクロファージによる抗原の捕捉を容易にするアジュバントの添加が必要となる場合があります。薬剤などの小さな分子は、免疫応答を刺激するために、より抗原性の高い構造（キャリアタンパク質）と結合させなければなりません。

大きな抗原分子の特徴の1つとして、これらの分子は、免疫化された動物において多数の抗体産生B細胞クローンの活性化を誘導します。その結果生じる抗体のポリクローナル混合物は、抗原の多様なエピトープを認識することができるため、一部の実験手技では有用なツールとなります。これらのポリクローナル抗体混合物は抗原表面の複数のエピトープと反応することから、多型、グリコシル化の不均一性、軽微な変性などの抗原の小さな変化に対して、モノクローナル（均一）抗体よりも寛容となっています。

抗体の作成に用いられた抗原によって、ポリクローナル抗体は、免疫原タンパク質と高い相同性を有するタンパク質の検出、または免疫原とは異なる種の組織サンプルにおける標的タンパク質のスクリーニングに用いることができます。また、ポリクローナル抗体を用いて作業する場合には、ポリクローナル抗体の産生に用いられた免疫原や、解析するサンプル中で起こり得る望ましくない交差反応性について、可能な限り多くの情報を得ることが特に重要となります。特に、高い相同性を有するタンパク質ファミリーなど、特有のエピトープを標的とするポリクローナル抗体の産生には、ペプチド免疫原が用いられることが多いです。

均一な抗体（モノクローナル抗体）は、Bリンパ球を不死化した培養細胞と融合し、ハイブリドーマを作成することによって作成することができます。ハイブリドーマは、全く同じ抗体のコピーを多数産生します。モノクローナル抗体は抗原の1つのエピトープと反応するため、この印象的な現象は診断を目的とした抗体の開発に役立っています。しかし、ポリクローナル抗体と比較し、モノクローナル抗体は抗原の化学処理によるエピトープの損失に弱くなっています。これは、同一の抗原に対して2種類以上のモノクローナル抗体を用いることによって解決することができます。

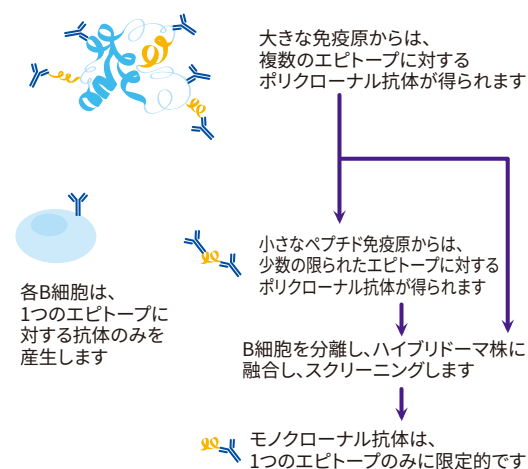


図 5.

モノクローナル抗体&ポリクローナル抗体の産生

ポリクローナル抗体の有用な特性

- ポリクローナル抗体は複数のエピトープを認識することが多いため、モノクローナル抗体よりも抗原の性質の小さな変化に寛容です。**変性タンパク質の検出には、ポリクローナル抗体が選択されることが多いです。**
- ポリクローナル抗体は、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ロバ、ニワトリなどの様々な動物種で産生することができるため、実験デザインの選択肢が多くなっています。
- ポリクローナル抗体は、未検討の種における抗原の性質が不明であるときにも用いられる場合があります。
- ポリクローナル抗体は複数のエピトープを標的とするため、一般的に検出力がより頑健となっています。

モノクローナル抗体の有用な特性

- モノクローナル抗体は特異的であるため、アッセイの一次抗体として、または組織中の抗原の検出に優れており、ポリクローナル抗体よりもバックグラウンドシグナルが著しく低いことが多いです。
- ポリクローナル抗体と比較し、モノクローナル抗体の均一性は非常に高くなっています。
- 実験条件が一定に保たれている場合には、モノクローナル抗体により、実験間で高度に再現性のある結果が得られます。
- モノクローナル抗体は、その特異性によって、親和性精製の場合など、関連する分子の混合物においても非常に効率的に抗原に結合できます。

表 2: ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の利点および欠点

	利点	欠点
ポリクローナル抗体	比較的産生しやすく、対費用効果が高い。	動物が死亡すると、抗体の供給源が途絶えてしまう。
	同一のタンパク質の複数のエピトープによって、多数の抗体が産生可能であるため、より頑強なシグナルが得られる。	採取した血液ごと（バッチごと）に結果が異なる場合がある。
	低レベルで発現しているタンパク質は、ポリクローナル抗体の方が良好なシグナルが得られる可能性がある。	新規の動物を同一の抗原で免疫化すると、異なるエピトープやクローンが産生される可能性がある。
	より広範なアプリケーションに対応可能。	異なるタンパク質に共通するエピトープによって、抗原タンパク質とは別のタンパク質が標識されてしまう可能性がある。
	ポリクローナル抗体は、抗原の認識においてより柔軟である。例として、多形やグリコシル化の不均一性などに関わらず、抗原に結合可能である場合があり、相同性の高いタンパク質や、異なる種のタンパク質を検出することができる。	バッチ間のばらつきが大きい可能性がある。
	変性タンパク質の検出に適している。	バックグラウンドシグナルを増加させる非特異的な抗体も産生される可能性がある。
モノクローナル抗体	単一の抗原の異なるエピトープに対して、それぞれ異なる抗体のクローンを産生可能である。	モノクローナル抗体の産生は、より労働集約的である。特にクローニングや選択の工程では、より多くの作業が必要となる。
	ハイブリドーマ細胞によって、同一の抗体を、無限に得ることが可能。	アプリケーションが限られている場合がある。
	モノクローナル抗体は高度に特異的であるため、バックグラウンドシグナルが最小化され、交差反応性が排除される。	大多数のモノクローナル抗体は、頑強な骨髄腫細胞株によってマウスで産生される。
	均一性が非常に高く、安定した、再現性のある結果が得られる。	モノクローナル抗体は高度に特異的であるため、複数の種での使用は限られている。
	関連するタンパク質の混合物においても、1つの抗原にしか結合しない。	モノクローナル抗体は、抗原の化学処理によるエピトープの損失に弱い。
	バッチ間のばらつきが少ない。	

クローン番号

各クローン番号は、抗体の産生に用いられた細胞株を表しています。抗体は1つ以上のホストによって産生されるため、クローン化された各細胞株には、個別のクローン番号が割り当てられます。抗原を注射された動物は、多数のエピトープに対する複数の抗体を産生します。抗体はB細胞によって産生されるため、B細胞の単一のクローンは、単一のエピトープのみを対象とする抗体を産生します。

- モノクローナル抗体は、細胞の単一のクローンから得られるため、大量に産生することができます。ポリクローナル抗体は、抗原の異なるエピトープに対して産生された複数の抗体のクローンを含有しています。例として、抗原にエピトープが4つある場合には、4種類の異なる抗体のクローンが産生されます。

- モノクローナル抗体は、細胞の単一のクローンから得られるため、大量に産生することができます。
- ポリクローナル抗体は、抗原の異なるエピトープに対して産生された複数の抗体のクローンを含有しています。例として、抗原にエピトープが4つある場合には、4種類の異なる抗体のクローンが産生されます。
- 異なる抗体のクローンは性質が異なっている場合があり、アイソタイプも異なっている可能性があります。これらの抗体では、機能するアプリケーションも異なっている場合があるため、選択したアプリケーションにおいて最適に機能する抗体のクローンを選択することが重要です。
- クローン番号は、ロット番号と同義ではないことに注意する必要があります。ロット番号は、通常は製造日を表しています。

1.9 抗体のフォーマット

抗体のフォーマットとは、抗体の形状または精製状態を指します。様々なフォーマットについて、以下に説明します：

ポリクローナル抗体は、比較的粗製されていないフォーマットとして入手可能なことが多く、これは「抗血清」または単に「血清」と呼ばれます。**抗血清**とは、免疫化された動物の血液から、凝固タンパク質や赤血球を除去したものを指します。抗血清は、その名が示唆するとおり、すべてのクラスの抗体／免疫グロブリンや、その他の血清タンパク質が含まれたままの状態です。標的抗原を認識する抗体に加え、抗血清は、その他の様々な抗原に対する抗体も含有しているため、免疫学的アッセイでは、非特異的な反応が起こる場合もあります。この理由により、未処理の抗血清には、血清タンパク質を除去し、標的抗原と特異的に反応する免疫グロブリンの分画を濃縮するため、精製処理を実施することがよくあります。

抗血清は、一般的に、プロテインA／G精製または抗原アフィニティークロマトグラフィーのいずれかによって精製されます。

プロテインA／G精製では、免疫グロブリンのFcドメインに対する黄色ブドウ球菌プロテインA、または連鎖球菌プロテインGの高い親和性を利用しています。プロテインA／G精製によって、未処理の抗血清から大部分の血清タンパク質が除去されますが、非特異的な免疫グロブリン分画は除去されません。このため、プロテインA／G精製した抗血清は、依然として不要な交差反応を起こす可能性があります。付録のプロテインA／G結合の親和性を参照してください。

抗原アフィニティー精製では、特異的な免疫グロブリン分画が持つ、その免疫グロブリンの産生に用いられた免疫抗原に対する親和性を利用しています。この方法は、調製物から不要な抗体を除去するために用いることができます。抗体の調製物を、不要な抗体が標的とする抗原を含有するカラムマトリックスに通します。不要な抗体はカラムに結合するため、溶出物にはアフィニティー精製された目的の抗体が含有されています。別の方法としては、目的の抗原を結合させたカラムマトリックスを用いることもできます。この場合は、カラムに結合させた抗原を標的とする抗体がカラムに結合して残るため、その後、抗原 - 抗体結合を妨害する溶液を用いて溶出します。プロテインA／G精製とは異なり、抗原アフィニティー精製では、非特異的な免疫グロブリン分画の大部分が除去され、標的抗原と特異的に反応する免疫グロブリン分画が濃縮されます。結果として得られるアフィニティー精製された免疫グロブリンには、主に望ましい特異性を有する免疫グロブリンが含有されています。

通常、アフィニティー精製された抗体は、未吸収の抗体よりもバックグラウンドが低くなっているため、この精製工程は、困難な、または状態依存型のエピトープの場合は特に重要となります。翻訳後修飾を有する標的を認識するポリクローナル抗体を開発する場合には、精製工程において修飾特異的な抗原アフィニティークラムを用いることによって、状態依存型の標的に対する抗体の特異性を著しく改善することができます。アフィニティー精製（固定化・修飾された標的タンパク質を使用）の前に、血清中の未修飾の標的タンパク質を枯渇させると、修飾された標的に対する特異性が増加します。その後、抗体が翻訳後修飾型のタンパク質しか認識しないことを確認するために、特異性試験を実施することができます。

モノクローナル抗体は、培養細胞で増殖させ、ハイブリドーマ上清として回収するか、マウスやラットで増殖させ、比較的未精製の腹水として回収することができます。ポリクローナル抗体の場合と同様に、これらもプロテインA/G精製または抗原アフィニティークロマトグラフィーによって精製されます。

未精製の抗体調製物によって、特異抗体の濃度は著しく異なります。特定の未精製の抗体調製物の特異抗体濃度が不明である場合には、以下の「通常範囲」をガイドラインとして参照し、推定することもできます：

ポリクローナル抗血清：特異抗体の濃度は、通常は1〜3 mg/mLの範囲です。

ハイブリドーマ上清：特異抗体の濃度は、通常は0.1〜10 g/mLの範囲です。

腹水(未精製)：特異抗体の濃度は、通常は2〜10 mg/mLの範囲です。



テクニカルヒント

精製された調製物の抗体濃度は、BSAなどの安定化タンパク質を添加する前に測定しましょう。

1.10 抗体の生物学的作用

抗体は、感染病原体からの生体保護のためにさまざまな機能を持っています。ほとんどのワクチン(微生物抗原)は、感染を阻止する、または微生物による血流への侵入に干渉する抗体の産生を誘発します。このためには、抗体が、中和またはオプソニン化貪食作用という点において機能的でなければなりません。

膜侵襲複合体(MAC)の細胞溶解

MACは、補体系の活性化(古典経路ならびに代替経路の両方)の結果として、病原性細菌細胞の表面上に形成されます。MACは、細菌の細胞壁に膜貫通型チャネルを形成し、リン脂質二重層を破壊することによって、細胞溶解や細胞死を誘発します。

ウイルスの中和

抗体は、ウイルス粒子による受容体への結合に干渉し、細胞への取り込みを阻害します。多数のエンベロープウイルスは、抗ウイルス抗体や補体系によって膜が破壊されると溶解します。一部の抗体は、ウイルス粒子を凝集させることもできます。ウイルス感染後には、非中和抗体も産生されます。これらの抗体はウイルス粒子に特異的に結合するものの、中和することはしません。反対に、ウイルス-抗体複合体は、エンドサイトーシスによって細胞内に進入するため、感染力を高めてしまう場合もあります。これによってウイルス増殖が起こることもあります。

この種の抗体が産生されると、ウイルス感染の予後にも影響が及ぶ場合もあります。例として、ポリオウイルスは、血中のIgMおよびIgG産生を誘発しますが、感染の阻害には粘膜のIgAが重要となります。IgAは、一次感染部位である腸内でポリオウイルスを中和します。弱毒生ワクチンであるSabinポリオウイルスは、強力な粘膜IgA応答を誘発するため、より効果的になっています。

固定化

抗体は、運動性細菌または原生動物の繊毛または鞭毛を標的とすることができます。結果として、運動が止まり、動き回って感染を広めることができなくなります。

細胞溶解

一部の抗体は、微生物の膜を破壊し、細菌細胞を死滅させることができます。これには補体系の関与が必要となります。

オプソニン化

この過程では、病原体が食細胞による貪食の標的となります。抗体が、細菌の細胞膜上の受容体に結合し、食細胞を誘引します。抗体のF(ab)部分が抗原に結合する一方、抗体のFc部分は食細胞のFc受容体に結合し、貪食を促進します。この過程は補体系によってさらに増強されます。

外毒素の中和

微生物の毒素に対しては、抗毒素抗体が産生される場合があります。外毒素の結合部位のエピトープに対して産生された抗体のF(ab)領域によって、外毒素による宿主細胞の膜上の外毒素受容体への結合を阻害することができます。これによって、毒素の細胞内への侵入が防止されます。

宿主細胞への細菌接着の防止

身体に生まれつき備わった防御力によって、細菌を物理的に除去することができます。これは、皮膚や粘膜から、表面上皮細胞が絶えず脱落することによります。しかし、細菌は、細胞壁接着タンパク質である線毛や、バイオフィルムを産生する莢膜を産生することによって上皮細胞の脱落に対抗します。抗体のF(ab)領域は、線毛の接着性の先端、細胞壁アドヘシン、または莢膜分子に結合し、宿主細胞への細菌接着を阻止します。

微生物の凝集

IgMおよびIgA抗体のF(ab)部位は、微生物同士を接続させ、凝集を引き起こすことができます。凝集した微生物は、より効率的に貪食されます。

知っておくと便利なテクノロジー

抗体の特異性を試験するドットブロットアッセイ

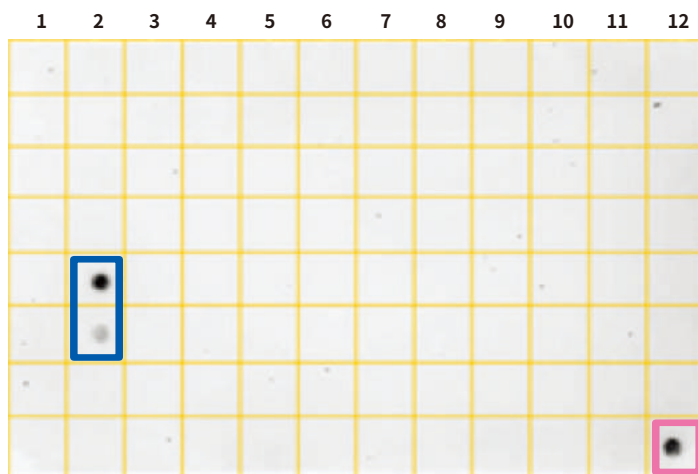
クロマチン免疫沈降法や、その他の感度の高い抗体に依存した解析を実施する場合、抗体の特異性は重大な意味を持ちます。ヒストンタンパク質に対する翻訳後修飾は多様であるため、抗体の特異性や精度が低下し、結果のばらつきや、データ解釈の誤りが生じます。ほとんどの抗体は、多様な修飾間の交差反応性について試験されていませんが、ジメチル化からトリメチル化への変化など、タンパク質の状態の小さな変化でさえも、生物学的に重大な意味を有していることがあります。ドットブロットアレイの作成は、特異性について抗体をスクリーニングするために有効な方法です。

AbSurance™ Histone Antibody Specificity Array (例: カタログ番号16-667) で用いられているテクノロジーは、特性が詳細に明らかにされており、広く論文に用いられている弊社ヒストン抗体のスクリーニングに用いられているテクノロジーと同じものです。操作が簡単な Immobilon®-FL PVDF membrane を用いて作成されたこれらのアレイによって、主要なヒストン修飾部位に対する抗体の詳細な機能解析が可能となります。AbSurance™ のスクリーニング工程は、単純なウェスタンブロットの様な手順であり、その後X線フィルムか CCD 画像のいずれかを用いて検出を行います。

AbSurance™ の利点

- 高品質の精製されたペプチド (純度 95% 超)
- すべての主要なヒストン修飾部位 (アセチル、ホスホ、およびモノ、ジ、およびトリメチル翻訳後修飾) を表す 89 種類のペプチド
- 特許工程による一貫した均一なペプチドスポット
- フィルムまたは CCD 画像のいずれかによる高感度な化学発光検出法
- 追加ソフトウェアを必要としない簡単なデータ解析
- ラット、マウス、ヒツジ、ウサギ由来のビルトインの陽性コントロール一次抗体

A. アセチルヒストンH4 (Lys12)



B. 試験したH4抗体およびコントロールIgGとの反応性の位置

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	H2A 1-19 未修飾	H2A 1-19 SIP	H2A 1-19 K5ac	H2A 1-19 K9ac	H2A 1-19 K13ac	H2A 110-129 未修飾	H2A 110-129 T120P	H2A 124-142 未修飾	H2A.X 124-142 S139P	H2A.X 124-142 Y142P	H2B 1-19 未修飾	H2B 1-19 K5ac	100 ng
B	H2A 1-19 未修飾	H2A 1-19 SIP	H2A 1-19 K5ac	H2A 1-19 K9ac	H2A 1-19 K13ac	H2A 110-129 未修飾	H2A 110-129 T120P	H2A.X 124-142 未修飾	H2A.X 124-142 S139P	H2A.X 124-142 Y142P	H2B 1-19 未修飾	H2B 1-19 K5ac	10 ng
C	H2B 1-19 K5me1	H2B 1-19 K12ac	H2B 1-19 S14P	H2B 1-19 K15ac	H2B 107-125 未修飾	H2B 107-125 K120ac	H4 7-26 未修飾	H4 7-26 SIP	H4 7-26 R3me1	H4 7-26 R3me2a	H4 7-26 R3me2s	H4 7-26 K5ac	100 ng
D	H2B 1-19 K5me1	H2B 1-19 K12ac	H2B 1-19 S14P	H2B 1-19 K15ac	H2B 107-125 未修飾	H2B 107-125 K120ac	H4 7-26 未修飾	H4 7-26 SIP	H4 7-26 R3me1	H4 7-26 R3me2a	H4 7-26 R3me2s	H4 7-26 K5ac	10 ng
E	H4 1-19 K8ac	H4 1-19 K12ac	H4 11-30 未修飾	H4 11-30 K16ac	H4 11-30 R17me1	H4 11-30 R17me2a	H4 11-30 R17me2s	H4 11-30 R19me1	H4 11-30 R19me2a	H4 11-30 R19me2s	H4 11-30 K20ac	H4 11-30 K20me1	100 ng
F	H4 1-19 K8ac	H4 1-19 K12ac	H4 11-30 未修飾	H4 11-30 K16ac	H4 11-30 R17me1	H4 11-30 R17me2a	H4 11-30 R17me2s	H4 11-30 R19me1	H4 11-30 R19me2a	H4 11-30 R19me2s	H4 11-30 K20ac	H4 11-30 K20me1	10 ng
G	H4 11-30 K20me2	H4 11-30 K20me3	H4 11-30 R23me1	H4 11-30 R23me2a	H4 11-30 R23me2s	H4 82-100 未修飾	H4 82-100 K19ac	100 ng			ラット IgG	ヒツジ IgG	100 ng
H	H4 11-30 K20me2	H4 11-30 K20me3	H4 11-30 R23me1	H4 11-30 R23me2a	H4 11-30 R23me2s	H4 82-100 未修飾	H4 82-100 K19ac	10 ng			マウス IgG	ラビット IgG	10 ng

ヒストンH4抗体の特異性スクリーニング

A. ヒストンH2A、H2B、H4アレイを、anti-acetyl histone H4 (Lys12) antibody (1:2,000希釈、カタログ番号04-119) でプローブし、Donkey anti-rabbit IgG, peroxidase conjugated, H+L (カタログ番号AP182P) 二次抗体を用い、化学発光法でペプチドを視覚化した。B. 反応性のペプチドスポット (紺) の位置を示すペプチドマップ。コントロールのウサギIgGは水色で示されています。



2

抗体の実用

- 2.1 選択および使用
- 2.2 抗体の力価および濃度
- 2.3 抗体の保存および取り扱い
- 2.4 標識抗体
- 2.5 二次抗体の使用
- 2.6 適切なコントロール
- 2.7 抗体を用いた論文発表
- 2.8 抗体の検証

2.1 選択および使用

抗体を選択する際の考慮点

標的の抗原を特定し、検出法を選択した後は、標的を検出するために1種類以上の一次抗体を選定しなければなりません。対象の標的に対して1種類以上の抗体が利用可能である場合には、複数の抗体を用いて主要な実験を実施する方がよい可能性があります(第2.7章、抗体を用いた論文発表を参照してください)。次の点に考慮し、抗体を選定しましょう:

研究のニーズに最適なアプリケーションの決定:

- すべての抗体が各アプリケーションで機能するわけではありません。
- 実施するアッセイが、定性的または定量的であるのかを判定します。
- 抗体が、免疫ブロット法やELISAなどの特定のアプリケーションに適切であるかどうか、販売業者のデータシートやウェブサイトを確認します。

試験するサンプルの種類:

- 対象の組織または細胞は、特定のタンパク質を発現していますか?
- 検出しようとしているタンパク質は、潜在型または活性型ですか?例として、リン酸特異的抗体は、活性化されたリン酸化タンパク質としか反応しない可能性があります。
- 対象のタンパク質が細胞内に位置している場合、細胞の一部あるいは全体を溶解する必要があります。
- フローサイトメトリー解析では、細胞表面分子を認識する抗体を使用する必要がある場合があります。
- 対象のタンパク質が立体構造をとっており、エピトープが不明瞭である場合には、非変性状態では抗体によって認識されないため、サンプルを変性させなければなりません。
- 一部の抗体は、凍結した、または固定されていない組織においてのみ良好に機能し、その他は、抗原賦活化工程後のパラフィン包埋切片においてのみ機能します。

検出対象のタンパク質が由来する種:

- 対象の種から得られた免疫原配列に対して産生された抗体を選択します。
- 配列が対象の種に由来するものではない場合、対象のサンプルと反応するかどうか確認します。特定のタンパク質の配列については、タンパク質データベースで迅速に確認することができます:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>

抗体の産生に用いられた種:

- この情報は、二次抗体を選択する際に非常に有用です。二次抗体は、サンプルが得られた種と、系統学的に可能な限り離れている必要があります。

データシートや販売業者のウェブサイト上で入手可能な

検証データを確認:

- データシートや販売業者のウェブサイト上の検証データを確認し、データの品質を検討します。
- 抗原の有無が検証されていないのか(ELISA、ウェスタンブロット)、その他の詳細なデータがあるのかどうかを確認します。
- どのような種類のサンプル(細胞溶解液、組織ホモジネートなど)が試験されているのかを確認します。精製された組換えタンパク質しか用いられていない場合、実際の細胞や組織サンプルでは最良の結果が得られない可能性があります。

保証およびサポート:

- 返金またはクレジットなど、販売業者からの保証はありますか?
- どのような種類のテクニカルサポートが利用可能ですか?ウェブサイト上の「よくある質問(FAQ)」よりも、実際のテクニカルサポートが利用可能である方が良いでしょう。

2.2 抗体の力価および濃度

抗体と抗原の結合は結合定数に依存していますが、結合定数は温度、pH、溶媒の組成などの影響を受けます。溶液中の抗体と抗原の相対濃度を変化させることによって、抗原抗体複合体の形成を制御することができます。

濃度と力価は同じではありません。濃度は、溶液中に含有されている抗体の総量です。通常、抗原に結合する能力という点に関して、活性型の機能的な抗体は総量の一部に過ぎず、これが有効性を決定しています。力価は、イムノアッセイにおいて反応が生じる抗体の最大希釈率です。抗体-血清溶液を希釈しても、依然として検出可能な量の抗体が認められる程度を表しています。

ほとんどの場合、サンプル中の抗原の濃度を調節することはできません。このため、特定の実験条件ごとに、抗体の至適な作用濃度（希釈率）を経験的に判定しなければなりません。

どのようなアッセイでも、至適な力価は、陽性の試験で最も強力な反応が得られ、バックグラウンド反応が最小である濃度（希釈率）です（例、陰性コントロール）。各アッセイについて、至適な抗体濃度を経験的に判定しなければなりません。これは、通常は希釈系列を用いて判定します。

至適な抗体濃度を判定する最良の方法としては、最初に一定のインキュベーション時間を選択し、一連の希釈液を用意して試験します。希釈率は、通常は望ましい溶液の総量に対する、より濃度の高い原液の比として表されます。例として、抗体の1:10希釈は、抗体の原液1を希釈剤9と混合し、合計10にすることによって調製します。

データシートやプロトコールに、抗体の使用に適切な希釈率が推奨されている場合もあります。ある抗体を初めて使用する場合、または抗体の新規のロットを用いて作業する場合には、使用に至適な抗体の希釈率を判定するため、希釈系列を用いることが推奨されています。例として、もし製品データシートに1:500希釈を用いるよう推奨されているならば、1:50、1:100、1:500、1:1,000、および1:10,000の希釈を用いると、特定のアッセイ条件に際して至適な希釈率を判定する助けとなります。特に、ポリクローナル抗血清の場合、抗体濃度が動物によって、または採取した血清によって著しく異なっている可能性があるため、このような初期の力価測定は、アッセイ間のばらつきを減少させるために必要不可欠です。

2.3 抗体の保存および取り扱い

抗体の機能や寿命に関し、適切な保存や取扱いは非常に重要です。適切に保存された抗体は、長期間にわたってもほとんど分解されないため、数カ月、場合によっては数年間も有用です。一方、不適切に保存された抗体は、数時間単位で変性してしまうこともあります。抗体やその他の生物学的試薬の保存および取扱いに際しては、以下の点を考慮しましょう：

- 最大限の反応性を保つため、試薬は製造業者の指示に従い保存します（例、2～8℃で保存とされている場合には、抗体を室温で保管することは避けます）。
- 抗体は密閉された容器に入れ、霜取り不要ではない冷蔵庫／冷凍庫で、組織固定液や架橋試薬とは離して保存します。
- 抗体は、比較的安定したタンパク質で、幅広い軽度の変性条件には耐性があります。ほとんどの抗体は、製造業者の推奨に従い適切に保存した場合、数年間にわたり安定です。
- ほとんどの場合、抗体は-20℃で結合能を損なうことなく保存可能です。
- 抗体を、霜取り不要の冷凍庫で保管することは避けましょう。これは、凍結・融解の繰り返しを避ける、または最小にするためです。抗体溶液は、繰り返し凍結・融解しないようにします。これは、凍結融解の繰り返しによって抗体分子の凝集が起こり、活性が損なわれる可能性があるためです。このため、原液は保存前に分注するようにします。
- 未希釈の抗体は、抗体の変性を引き起こす恐れがある凍結・融解の繰り返しを最小にするため、-20℃で保存する前に必ず分注します。抗体を濃縮された状態で保存すると、分解が防止または最小化されます。グリセリンなどの凍害保護物質を、最終濃度が50%になるように抗体溶液に加えると、凍結・融解によるダメージが防止できます。グリセリンを含有する抗体は、-80℃で保存しないようにしましょう。
- BSA (1% w/v) などの安定化タンパク質が添加されていない限り、作業のために希釈した抗体を長期間保存すべきではありません。希釈した抗体を長期間保存することは避けましょう。
- 保存中に起こる主な問題としては、細菌または真菌によるコンタミネーションがあります。抗体を2～8℃で2～3日以上保存する場合には、ろ過滅菌、および／または0.05%アジ化ナトリウムまたは0.1%チメロサルなどの静菌剤／保存剤を添加することが推奨されています。

- アジ化ナトリウムは、様々な生物学的アッセイや、一部の結合方法に干渉する恐れがあります。このため、このようなアプリケーションでは、アジ化ナトリウムを、遠心ダイアフィルトレーション、透析、またはゲルろ過のいずれかによって除去するか、アジ化物を含有しない抗体を用います。注意：アジ化ナトリウムは有毒です。すべての実験用試薬と同様に、取扱いに関する注意については、化学物質等安全データシート (MSDS) をご覧ください。
- 一般的に、酵素標識した抗体は、酵素活性や結合能の損失を防止するために凍結させません。このような抗体は +4°C で保存します。
- 蛍光標識した抗体は光褪色しやすいため、暗色のバイアルに入れ、遮光して保存します。
- 長期間保存した場合、一部の抗体溶液では、不溶性の脂質成分が生じる場合があります。10,000 g で急速に遠心分離すると、沈殿物を除去することができます。

2.4 標識抗体

濃度、保存バッファー、および保存温度に関する注意

シグナル増幅や検出のために、精製された抗体を、ホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP)、アルカリホスファターゼ (AP)、ローダミン、フルオレセインイソチオシアネート (FITC)、またはビオチンなどの酵素、蛍光プローブ、またはハプテンで標識することがよくあります。標識抗体によって安定性が異なり、長期間にわたり最大の活性を保持す

るために必要なバッファーや保存条件も異なります。以下の表に、精製済みの弊社の抗体および標識抗体について、標準的な抗体バッファーおよび保存条件を示します。これは全般的なガイドラインであり、特定の抗体の保存条件については、必ずその抗体に添付されたデータシートを参照する必要がありますことに注意してください。

抗体バッファー

1. アフィニティー精製されたポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体

0.02 M リン酸バッファー、0.25 M NaCl、
0.1% NaN₃、pH 7.6
必要に応じて、NaN₃ を含有しない同一の
バッファーを用いることもできます。

2. FITC 標識体

0.02 M リン酸バッファー、0.25 M NaCl、
15 mg/mL BSA、0.1% NaN₃、pH 7.6

3. HRP 標識体

0.01 M PBS、15 mg/mL BSA、
0.01% チメロサル、pH 7.1

4. アルカリホスファターゼ標識体

0.05 M Tris、0.1 M NaCl、0.001 M MgCl₂、
15 mg/mL BSA、0.1% NaN₃、pH 8.0

5. ビオチン標識体

0.01 M PBS、15 mg/mL BSA、0.1% NaN₃、pH 7.1

標準的な抗体濃度

精製された標識モノクローナル抗体	1 mg/mL
アフィニティー精製された ポリクローナル抗体	2 mg/mL
FITC 標識ポリクローナル抗体	2 mg/mL
HRP / アルカリホスファターゼ 標識ポリクローナル抗体	1 mg/mL

抗体の保存条件

アフィニティー精製された ポリクローナル抗体	4°C – 8°C
蛍光標識抗体 (暗所で保存)	4°C – 8°C
酵素標識抗体 (凍結禁止)	4°C – 8°C
ハプテン標識抗体 (凍結禁止)	4°C – 8°C

2.5 二次抗体の使用

二次抗体は、最初に一次抗体を結合させた抗原を、間接的に検出するために良く使用されます。このため、一次抗体の抗体種やアイソタイプに特異性を有し、検出可能なタグが標識に結合した二次抗体を選択することが重要です。以下の点を考慮しましょう：

- ・ 検出可能なタグには、酵素や蛍光色素があります。一般的に用いられるタグは、ホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP)、アルカリホスファターゼ (AP)、フルオレセインイソチオシアネート (FITC)、ローダミン、テキサスレッド、フィコエリスリン (PE)、ビオチンです。
- ・ 二次抗体を適切に選択することによって、染色が改善され、偽陽性または偽陰性が最小化されます。
- ・ 利用可能な標識一次抗体がない場合、または一次抗体が望ましい酵素や蛍光色素で標識されていない場合、二次抗体が使用されます。
- ・ 二次抗体は、検出の感度を上げるためにも用いられています。二次抗体の使用によって作業工程が増えることになりませんが、複数の二次抗体が単一の一次抗体に結合することから、シグナルが増幅され、感度が上がるという利点があります。
- ・ 二次抗体は、宿主動物を、異なる種から得られた抗体で免疫化して産生させます。例として、抗ヤギ抗体は、ヤギの抗体をヤギ以外の動物に注射することによって産生させます。このように、一次抗体をマウスで産生させた場合には、二次抗体は別の種 (ヤギ、ロバなど) で産生させた抗マウス抗体である必要があります。
- ・ ELISA検出には、酵素標識抗体が良い選択肢となります。フローサイトメトリーには、蛍光色素標識二次抗体の使用が最適です。
- ・ 大多数の一次抗体は、IgGクラスの抗体です。これらの抗体は、適切な抗種IgG二次抗体によって検出することができます。一次抗体がIgMであれば、IgMに特異的な二次抗体を選択する必要があります。

適切な二次抗体の選択：

- ・ 二次抗体は、一次抗体を産生させた種と同一の種に対するものである必要があります。例として、一次抗体をヤギで産生させた場合には、二次抗体は抗ヤギ抗体である必要があります。
- ・ 専門知識や、実験室で利用可能な機器に基づき、望ましい蛍光色素が酵素で標識した抗体を選択します。最も一般的に用いられる蛍光色素標識は、フルオレセイン、ローダミン、テキサスレッド、フィコエリスリンなどです。酵素標識には、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼなどがあります。

- ・ ビオチン標識抗体は、蛍光色素や酵素で標識した二次抗体よりも、感度が高く、増幅されたシグナルが得られます。
- ・ 最良の結果を得るためには、サンプルと同一の種から採取した血清で事前に吸着させた二次抗体を使用します。これによってバックグラウンドが減少します。しかし、このような事前に吸着させた抗体では、エビトープの認識力が低下し、一部のIgGサブクラスは認識されない恐れがあります。
- ・ アフィニティー精製された二次抗体では、非特異的結合が最小になります。しかし、親和性の高い抗体を含有している場合には、IgG分画の方が好ましい場合もあります。これは、抗原が非常に低いレベルで存在している場合には、大きな利点となります。
- ・ 使用する一次抗体のクラスまたはサブクラスに一致する二次抗体を選択します。例として、一次抗体がマウスIgMであれば、抗マウスIgM二次抗体を用います。
- ・ マウスモノクローナル一次抗体のクラスまたはサブクラスが不明な場合は、ほとんどのマウスIgGサブタイプを認識する抗マウスIgGを用いても良いでしょう。

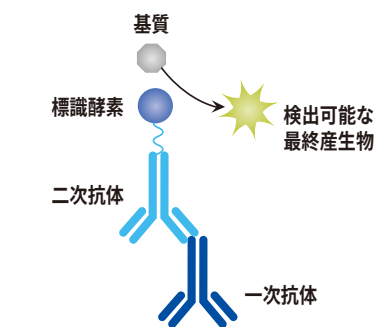


図 6.
一次抗体と二次抗体を用いた抗原検出の原理

2.6 適切なコントロール

適切なコントロールを使用することによって、偽陽性や偽陰性の結果が排除され、実験データを良好に解釈することが可能となります。抗体の特異性を証明する鍵は、正しいコントロールの使用である場合がよくあります。コントロールは、実験設計工程を通してトラブルシューティングにも重要です。次の点を考慮しましょう：

- ・可能な限り、陰性および陽性コントロールの両方をアッセイに含めます。
- ・陽性コントロールサンプルとしては、対象となる抗原を含有することが知られており、信頼性の高い方法によって陽性であることが実証済みである細胞、細胞株、または精製タンパク質があります。
- ・陰性コントロールサンプルとは、対象となる抗原を欠いていることが知られているサンプルです。対象のタンパク質を発現しないことが知られている細胞株や組織は、良い陰性コントロールとなります。
- ・サンプルのコントロールに加え、試薬のコントロールも用いる必要があります。
- ・1回に変更する実験変数は1つのみにするようにしましょう。
- ・一次抗体および二次抗体について、別々のコントロールを試験する必要があります。
- ・抗体は、動物から採取した血液や精製バッチによって、力価が著しく異なっている可能性があるため、新規のバッチの抗体は、既存のアッセイに用いる前に、検証し、条件を最適化しなければなりません。

優良試験所基準の一環として、すべての希釈率、希釈剤、インキュベーション時間、ロット番号、すべての試薬の調製日、手順の完全な記録を保持することも重要です。このような情報は、効率的なアッセイの開発において非常に貴重です。

2.7 抗体を用いた論文発表

使用した技術に関わらず、陽性のシグナルは、特異的な抗体が特定の抗原に結合したことを示しているという基本的な免疫標識の仮説に戻ってみましょう。すべての技術と同様に、シグナルが実際に特異的で再現性があることを立証することが、科学的に重要となります。論文や助成金の

一次抗体の結合が特異的であり、非特異的に結合する免疫グロブリンによるバックグラウンドシグナルの結果ではないことを検証するためには、アイソタイプコントロールが用いられます。通常、アイソタイプコントロールは、特異的な一次抗体のホストの種とアイソタイプに一致したものです。例として、マウスにおいて産生されたIgG_{2b}タイプの抗体は、一部のヒト白血球に強力に結合します。このため、ヒト細胞や組織を解析する場合には、マウスIgG_{2a}アイソタイプコントロールを用いる必要があります。アイソタイプコントロールは、免疫沈降法、フローサイトメトリー、および免疫組織化学において、最も一般的に使用されています。多くのフローサイトメトリーでは、直接標識した一次抗体が用いられています。この場合は、一次抗体と同一の蛍光色素か標識を結合したアイソタイプコントロールを用いることが重要です。



ご存知ですか？

親和性成熟は、抗原曝露に対する適応応答で、アフィニティーによって選択される活性化B細胞の分化の過程です。宿主動物が同一の抗原に繰り返し曝露すると、より高い抗体結合親和性が誘発されます。時間の経過に伴い、産生された抗体は抗原により強力に結合し、より効率的に抗原に対処することができますようになります。

査読者らは、データ解析に関してますます批評的になってきているため、研究者は、実験技術が機能する基本的な原理について考察し、過剰な解釈を避けるよう注意する必要があります。次頁の表は、免疫データに対する信頼を支持する助けとなるはずです。

実際の査読者によるコメント	改良点
抗体が特異的であると確信できません	特異性を立証するために2種類以上の異なる技術を用いましょう;例として、WBはIHCのデータを実証することができます 別々の免疫原またはタンパク質の別々の領域に対して産生された2種類以上の抗体を用い、共局在を測定しましょう 適切なノックアウトサンプルに対する試験を実施しましょう
抗体が、関連するタンパク質と交差反応していないと確信できません	結果を確認するために、同一の抗原の保存されていないエピトープに対して産生された2種類以上の抗体を用いましょう
ウェスタンブロット上に1つ以上のバンドが示されている、またはサイズが間違っています。どうすれば特異性を示すことができますか？	切断産物またはグリコシル化のパターンに関して、発表されている論文を引用しましょう 変性および非変性ゲルを用いた実験の実施を考慮しましょう 同一のタンパク質に対する別の抗体を用いてリブロービングを行いましょう
抗体に基づくデータにおいて、エラーバーが大きすぎるようです	抗体のプロトコールを整理し、同一のロット番号の抗体が十分にあることを確認してください。同一ロットの抗体が十分にあれば、ロット間のばらつきのために各実験を最適化し直す必要はありません
シグナルのうち、どれくらいが実際にはバックグラウンドですか？	プロトコールを最適化し、ばらつきを減らしましょう(上記参照) ペプチド阻害アッセイを実施しましょう バックグラウンドを確立するため、一次抗体を用いずに実験を実施しましょう 直接蛍光標識一次抗体を用いて共局在化させましょう 同一種で事前に吸着した二次抗体を用いましょう
データの解釈を改善するため、モノクローナル抗体を用いて再度実験を実施してください	ポリクローナル抗体によって認識される標的に対し、多数のモノクローナル抗体が利用可能となっています 短いペプチドから作成されたポリクローナル抗体を選定し、クローン性やエピトープを最小化しましょう サンプルのマトリックス、エピトープ処理、検出環境間にわたる特異性を実証するため、複数のアプリケーションにおいて検証済みのポリクローナル抗体を選定しましょう
既知のエピトープを有する抗体を用い、再度実験を実施してください	多数の抗体配列は研究者や市販業者によって発表されており、入手することができます 抗体の特異性や実験の再現性の検証にあたり、配列決定されたエピトープは必要ありません データに対する査読を補助するために、抗体のカatalog番号や会社名を発表しましょう

2.8 抗体の検証

検証とは、特異的な実験手順の使用を通して、解析技術の性能や特性が目的とする用途に適切であることを示す工程です。

通常、抗体の特異性に関する最初の試験は、標的を既知のレベルで発現している多様な細胞株の細胞溶解液のウェスタンブロットです。ここでは、陽性および陰性コントロール細胞の両方を用います。検証工程の次のステップとしては、組織サンプルに対する抗体の力価を測定するため、免疫組織化学(IHC)か免疫蛍光法(IF)がよく行われます。

検証では、抗体が特異的かつ選択的であるのみならず、再現性のある結果を供することが可能であることが示され

なければなりません。このため、再現性が、検証工程の最後のステップとなります。

抗体の検証は、特に免疫組織化学において重要となっています。IHCデータの解析は、染色に影響を及ぼす解析前、解析中、および解析後の要因によって困難になる場合があります、これは、特に浮遊またはパラフィン包埋切片を用いる場合に顕著です。これらの要因については、第3.7章でさらに詳細に論じることとします。



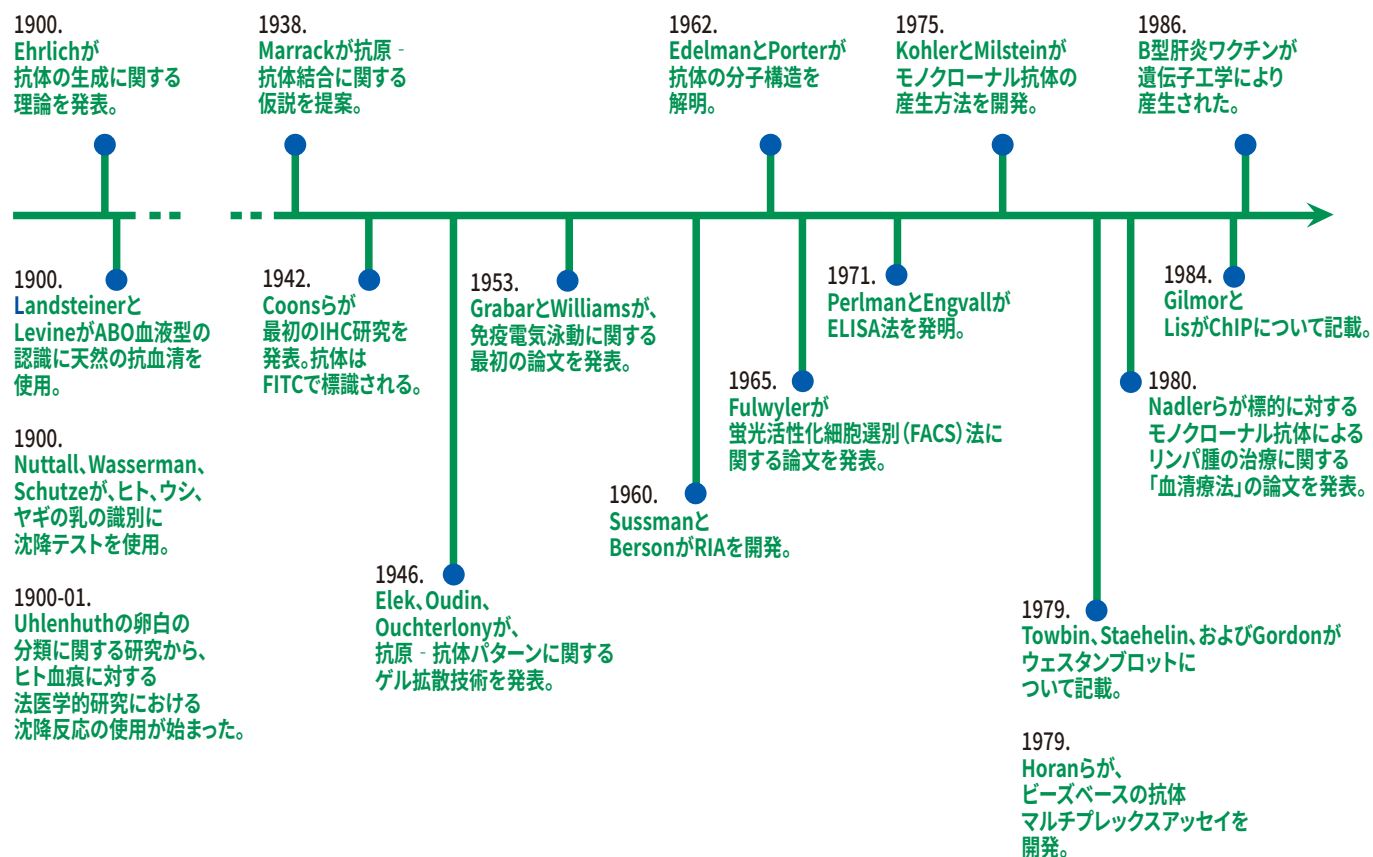
抗体の応用

- 3.1 抗体の応用の紹介
- 3.2 免疫沈降法
- 3.3 クロマチン免疫沈降法 (ChIP)
- 3.4 ウェスタンブロット
- 3.5 酵素結合免疫吸着検査法 (ELISA)
- 3.6 マルチプレックスビーズベース検出
- 3.7 免疫組織化学／免疫細胞化学
- 3.8 フローサイトメトリー
- 3.9 機能的阻害および刺激アッセイ

3.1 抗体の応用の紹介

19世紀末に、特異的な抗体 - 抗原相互作用の価値が認識されたことによって、多様な免疫テクノロジーが生まれ、そのほとんどが今日においても用いられています。血液成分を解析する沈降テストから、高度に専門化されたクロマチン免疫沈降技術や、自動イメージングフローサイトメトリーにおける免疫染色まで、抗体をベースとするツールは、生物学的および生物医学的研究において重要な役割を果たしています。本章では、現在用いられている主要な免疫技術の理論や応用について論じます。

免疫ツールの歴史



3.2 免疫沈降法

- 3.2.1 はじめに
 3.2.2 抗原の標識
 3.2.3 サンプル調製
 3.2.4 抗原抗体複合体の形成
 3.2.5 免疫複合体の沈降
 3.2.6 解析
 3.2.7 トラブルシューティング

3.2.1 はじめに

抗体 - 抗原沈降法または免疫沈降法 (IP) は、細胞や組織溶解液中の複合的タンパク質混合物から、特定の抗原を分離するために用いることができます。免疫沈降法は、貴重な探索ツールであることが実証されており、特定の抗原に関する重要な情報を確認するために、多くの実験室で日常的に取り入れられています。これらの用途には、機能的試験のための小規模な抗原精製、N末端配列解析、タンパク質 - タンパク質相互作用の検討、細胞や組織中における抗原の相対的存在量や化学量論的分布の測定などがあります。免疫沈降アッセイが成功するか否かは、元のサンプルにおける抗原の存在量と、抗原に対する抗体の親和性 (通常 10^8 M^{-1} 以上の親和性が必要となります) という2つの主要な要因に依存しています。

免疫沈降手順の開始前に、適切な実験コントロールが設置されていることを確認しましょう。コントロール抗体は、可能な限り特異抗体の性質に類似したものである必要があります。ポリクローナル抗血清では、同一の動物から得た免疫化前の血清が、理想的な陰性コントロール抗体となります。しかし、そのような血清が利用可能ではない場合には、同一種の別の動物から得た同濃度の免疫化されていない (正常な) 血清でも十分です。

免疫沈降法は、次の主要なステップにわけることができます：

- ・ 抗原の標識 (オプション)
- ・ サンプル調製 (抗原を遊離させるために細胞を溶解)
- ・ 抗原抗体 (免疫) 複合体の形成
- ・ 免疫複合体の沈降
- ・ 解析

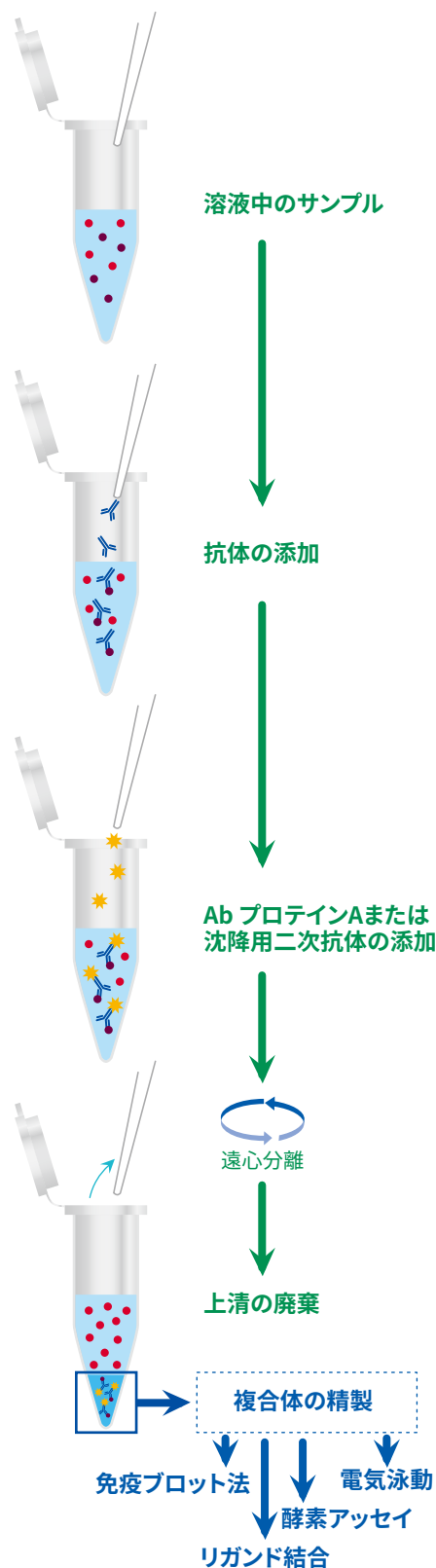


図 7.

これらのステップや、トラブルシューティングについては、以降の節で詳細に論じます。

3.2.2 抗体の標識(オプション)

抗原は、放射性前駆体 (^3H -チミジンなど) を含有する媒体中でのインキュベーション、表面タンパク質のヨウ素化またはビオチン化、放射性水素化ホウ素ナトリウム処置、またはその他の一般的な技術によって標識することができます。抗原の標識は任意で、ほとんどのIPアッセイでは必要ではありません。

3.2.3 サンプル調製

抗原抗体複合体の形成前に、抗原を、細胞または組織サンプルから、抗体によって認識可能な形態のまま効率的に抽出しなければなりません。これには、細胞内における抗原の位置(核内、細胞質内、膜結合型など)を考慮し、抗原の構造的な完全性への影響を最小にしながら、抗原の抽出に最適な方法を決定する必要があります。抽出／細胞溶解プロトコルの開始前に、免疫沈降法によってどのような情報を得たいのかを考えてみましょう。例えば、機能的試験のために機能的なタンパク質を抽出する必要がありますか？ また、タンパク質 - タンパク質相互作用を妨害するかどうか、細胞内で標的抗原と相互作用する可能性があるタンパク質を同時に免疫沈降するかどうかについても考慮する必要があるかもしれません。これらの点や、その他の考慮すべき点に基づき、適切な溶解方法を決定します。効果的な溶解方法は、経験的に判定されることが多いようです。

溶解手順において最も重要な点は、溶解バッファーの組成でしょう。溶解バッファーのイオン強度(塩濃度)、界面活性剤の種類、pHは、抽出効率や抗原の完全性に著しい影響を及ぼす可能性があります。pHが弱アルカリ性でイオン強度が低いバッファーは、通常はタンパク質の可溶化に好都合ですが、塩濃度が高くpHが低いバッファーは、抗原の変性や溶液中での凝集を引き起こす可能性があります。界面活性剤の選択は重大な意味を有し、抗原の細胞内における分布や、サブユニットをはじめとするタンパク質 - タンパク質相互作用を保持する必要があるのかどうかなど、多数の要因を考慮して選択する必要があります。

一般的に、非イオン性(例、Triton® X-100、NP40)または両性イオン性(例、CHAPS)界面活性剤は、非共有結合的なタンパク質 - タンパク質相互作用を保持する傾向にありますが、イオン性界面活性剤(例、SDS、デオキシコール酸ナトリウム)は、タンパク質 - タンパク質相互作用を変性させ、抗体が標的抗原を認識する能力に有害な作用を与える恐れがあります。

使用する溶解方法に関わらず、細胞溶解手順中に遊離するプロテアーゼによる標的抗原のタンパク質分解を防止するため、溶解バッファーには必ず適切なプロテアーゼ阻害剤(調製法については付録を参照してください)を加える必要があります。また、すべての溶液は事前に冷却し、溶解手順のすべてのステップは氷上で実施します。

溶解に必要な細胞数は、細胞株や、サンプル中において予測される標的抗原の存在量によります。一般的に、細胞溶解液は 10^7 細胞以上の細胞から調製し、溶解バッファー1 mLあたり 10^7 細胞とします。細胞溶解液の調製後、タンパク質濃度を測定し、細胞溶解液の濃度を、溶解バッファーかPBSで2~5 mg/mLに調節します。直ちに使用しない抽出液は分注し、急速に凍結させ、今後の使用のために -70°C で保存します。

注意

溶解バッファーにTriton® X-100を用いた場合、Triton® X-100は波長280 nmの光線を強力に吸光するため、280 nmにおける吸光度から、サンプル中のタンパク質濃度を判定することはできません。

一般的に、多くの細胞溶解液では、界面活性剤、還元剤、脂質が含まれていても、Direct Detect® Quantitation System(カタログ番号: DDHW00010-WW)などのFTIR分光法による直接的なタンパク質の定量によって、総タンパク質量を正確に定量することができます。

ヒント

抽出液のタンパク質濃度が0.1 mg/mL未満の場合は、凍結前に高純度BSAを1% (w/v) の濃度で添加しましょう。

3.2.4 抗原抗体複合体の形成

抗原を抽出した後、抗体を細胞溶解液に添加し、免疫複合体を形成させます。

3.2.5 免疫複合体の沈降

免疫複合体の沈降には、以下を用いることができます：

- ・ プロテインAまたはプロテインGアガロースビーズ
- ・ 沈降用二次抗体
- ・ プロテインAを含有する黄色ブドウ球菌細胞（カタログ番号 507858）

プロテインAまたはGに対する抗体の親和性は、免疫グロブリンのサブクラスや由来する種に依存します。例として、プロテインAは、すべてのウサギ由来一次抗体の免疫沈降に特に優れていますが、ニワトリ由来の抗体には適していません。

マウス一次抗体の免疫沈降にプロテインAを用いる場合には、プロテインA/Gを加える前に、5 µgのウサギ抗マウスIgG（沈降用二次抗体）を添加することが推奨されています（ゆっくり混合し、プロテインA/Gを加える前に、4°Cでさらに30分間インキュベーションしてください）。沈降にプロ

テインAまたはGアガロースを用いる場合、上記の手順に従い調製した抗原抗体複合体の量を沈降させるには、10～20 µLの50%プロテインA/Gアガローススラリーで十分です。

3.2.6 解析

免疫沈降したペレットは、2×SDSサンプルバッファーに再懸濁し、SDS-PAGEによって分離することもできます（ウェスタンブロットによる検出に関しては、第3.4章を参照してください）。精製した免疫複合体は、酵素解析、リガンド結合アッセイ、さらなる免疫反応やその他の免疫化学解析にも用いることができます。これらの手法を免疫沈降法と併用することによって、抗原について多大な情報を得ることができます。

知っておくと便利なテクノロジー

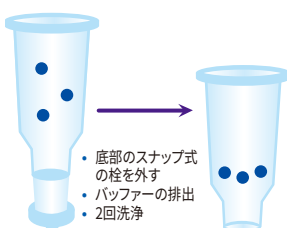
迅速、簡単、かつ再現性の高い免疫沈降法

Catch and Release®

弊社のCatch and Release® kitは、より迅速かつ簡単ながら高再現性を実現する、研究者のニーズに応えるキットです。Catch and Release® kitなら、様々な抗体を使用し多様なサンプルタイプから天然タンパク質あるいは変性タンパク質の精製が可能です。本キットはCo-IPならびにIP-キナーゼアッセイでも検証済みです。

カラムの平衡化

カラムには、抗体キャプチャーアフィニティリガンド（ACAL）を結合した樹脂スラリーが入っています



● カラム樹脂
— 抗体キャプチャーアフィニティリガンド（ACAL）
Y 抗体

結合

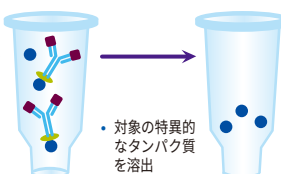
カラム内：
• 抗体に特異的なタンパク質が抗体に結合
• 抗体がACALに結合
• ACALが樹脂に結合
• カラム内で複合体が固定化

• 添加：
• サンプル
• ACAL
• 抗体
• インキュベーション

■ 標的タンパク質
★ 非特異的なタンパク質

洗浄

未結合の非特異的なタンパク質の除去



溶出

結合した標的タンパク質の溶出
標的タンパク質は、抗体およびACALとの複合体となっています



製品名	包装単位	カタログ番号
Catch and Release® v2.0 Reversible Immunoprecipitation System	50回分	17-500
Catch and Release® v2.0 Reversible Immunoprecipitation System	5回分	17-500A
Catch and Release® v2.0 High Throughput (HT) Immunoprecipitation Assay Kit- 96 well	96回分	17-501
Catch and Release® Phosphotyrosine, clone 4G10®	50回分	17-502

3.2.7 トラブルシューティング

免疫沈降法において最も一般的な問題は、洗浄した免疫複合体に混入するバックグラウンドタンパク質の数や種類をどのように減らせばよいかという問題です。バックグラウンドの問題は、様々な原因によって生じる場合があり、特異的であることも非特異的であることもあります。非特異的なバックグラウンドの問題に対処するには、以下の様な方法があります：

問題	考えられる原因	解決法
バックグラウンドが高い	細胞溶解液中の汚染タンパク質	一次抗体を加える前に、細胞溶解液をプロテインA／Gアガロースビーズで事前に精製します。 飽和量の、BSA、ゼラチン、アセトン粉末、または脱脂粉乳などの競合タンパク質を加えます。 一次抗体を加える前に、細胞溶解液を100,000×gで30分間遠心します（ペレットは廃棄）。
	抗体溶液中の夾雑物	抗体を、100,000×gで30分間遠心分離し（ペレットは廃棄）、力価を設定します。
	沈降用抗体の特異性が低い	別の抗体を試します。
	洗浄回数が不十分である	洗浄回数を増やします。洗浄ごとに、固相を洗浄バッファーに10分間「浸漬」します。
	抗体が多すぎる	一次抗体の濃度を低くします。
	インキュベーションが長すぎる	一次抗体とのインキュベーション時間を短縮します。
	二次抗体が非特異的に結合する	ウサギ抗マウス免疫グロブリン（沈降用二次抗体）をモノクローナル抗体と組み合わせて用いている場合は、沈降用二次抗体のみによるバックグラウンドを確認しましょう。必要に応じて力価を設定します。
	プロテインA／Gビーズがバックグラウンドを引き起こしている	バックグラウンドバンドが、プロテインA／Gビーズまたは抽出液によるものかどうかを判定するために、ウェスタンブロット解析中に、一次抗体を用いず、プロテインA／Gのみで沈降処理を行ったネガティブコントロール実験を実施します。
	計数パラメータを最適化する必要がある（放射活性アッセイ）	使用した放射性標識の1分間あたりのカウント数（cpm）を、抗原の検出に必要な最小値まで下げます。
ウェスタンブロット解析で複数のバンドが検出される	抗原が1つ以上のポリペプチド鎖からなっている、または付加的なポリペプチドを付随している	共に免疫沈降される付加的なタンパク質は、抗原の相互作用について理解する際に有用であることが多いため、問題とみなすべきではありません。
	共に溶出された捕捉抗体の重鎖または軽鎖が、標的タンパク質の検出に干渉している	抗体の共溶出を避けるために、架橋IP（捕捉抗体をプロテインA／Gに共有結合的に接合）を用います。
予測される分子量以下で複数のバンドが検出される	プロテアーゼ阻害剤カクテルの劣化などにより、サンプルがタンパク質分解を生じている可能性がある	新鮮なプロテアーゼ阻害剤を添加し、新しい細胞溶解液を調製します。このステップには、プロテアーゼ阻害剤カクテルを用いることもできます。

3.3 クロマチン免疫沈降法(ChIP)

主要なステップ

3.3.1 はじめに

- サンプル調製
- タンパク質とDNAの架橋
- 細胞溶解およびクロマチンの断片化

3.3.2 クロマチン免疫沈降法

- 洗浄、溶出および架橋の逆転
- DNA精製およびクリーンアップ
- PCR解析

3.3.3 ChIPテクノロジーにおける進歩

3.3.4 トラブルシューティング

3.3.5 FAQ

3.3.1 はじめに

クロマチン免疫沈降法(ChIP)は、染色体DNAに関連するタンパク質の*in vivo*分布のマッピングのために従来から用いられている強力な技術です。このようなタンパク質には、ヒストンサブユニット、転写因子、DNAに直接的または間接的に結合したその他の調節・構造タンパク質があります。

ChIPの成功には、染色体DNAの標的領域に関連するタンパク質を特異的に検出可能な、ChIPにおいて検証済みの高品質の抗体が必要となります。従来、特定のDNA配列が対象のタンパク質と関連しているかどうかを確認するために、ChIPの後にはエンドポイントPCRおよび／または定量PCR(qPCR)を実施します。このような古典的なアプローチの使用によって、研究者は、既知の標的遺伝子の数が限られていても、対象のタンパク質の相互作用を評価することができます。

ChIP実験は、次の主要なステップにわたることができます：

- サンプル調製
- タンパク質とDNAの架橋
- 細胞溶解およびクロマチンの断片化
- クロマチン免疫沈降法
- 洗浄、溶出および架橋の切断
- DNA精製またはクリーンアップ
- PCR解析

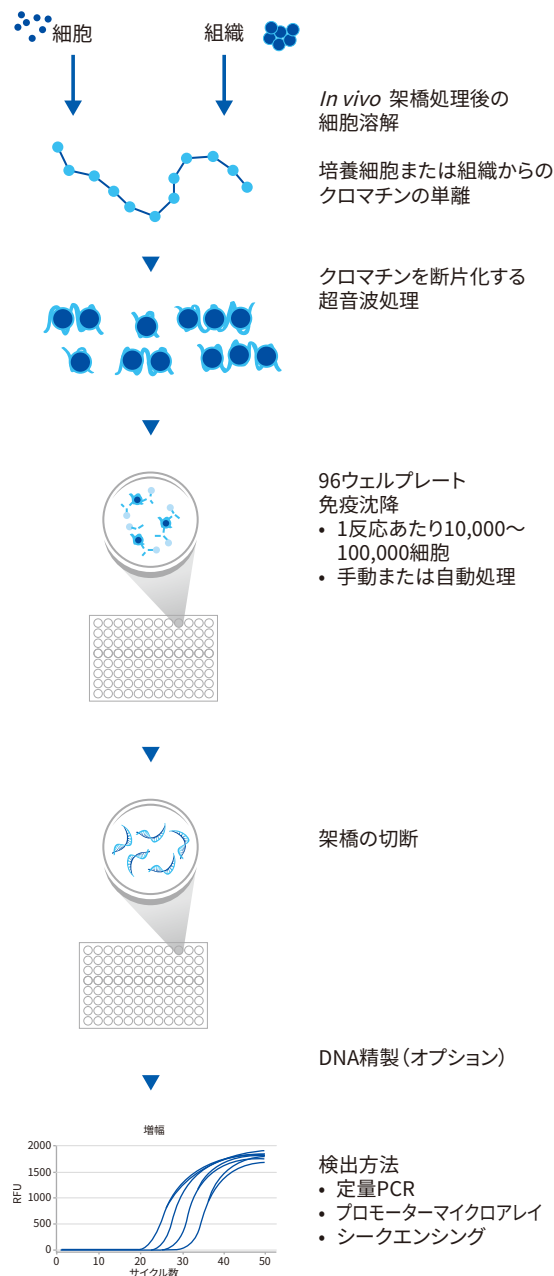
エピジェネティクス研究

エピジェネティクスは、DNA配列における遺伝的変化ではなく非遺伝的メカニズムによる遺伝子発現の変化を表します。こういった変化は、細胞特異的または組織特異的で、複数世代にわたって受け継がれることがあります。エピジェネティック制御は、多様な生物学的および環境的状况に対し、細胞がDNAベースの情報をコントロールして、多様な応答を示すことを可能にします。エピジェネティックな変化は、次のような機序を介して、転写や転写後の制御に影響を及ぼします：

- ヒストン修飾
- ヒストンバリエーションのヌクレオソーム上の位置
- クロマチンとヌクレオソームの再構築
- DNAのメチル化
- small RNAまたはncRNAを介したエピジェネティック制御

これらのメカニズムは、転写因子ならびにその他の核酸結合タンパク質と共に遺伝子発現を制御しており、DNA配列はどの細胞でも実質的に同じであるに関わらず、細胞の多様性を生み出しています。エピジェネティックな遺伝子の制御機序は、農業からヒトの健康に至るまで、幅広い分野の研究に影響を及ぼしています。

クロマチン免疫沈降法における抗体の使用については、下記に詳細に論じることとします。



ChIPキットによってクロマチン免疫沈降法が簡単に!

転写的活性を有する哺乳類細胞のクロマチン免疫沈降に最適化されたアッセイキットが、クロマチン免疫沈降 (ChIP) アッセイを非常に簡単にします。免疫沈降したクロマチンに含まれる遺伝子またはプロモーターの検出については、依然として研究者が経験的に判定しなければなりません。多様な検出技術が使用可能ですが、定量PCRシーケンシング、またはドットプロット解析が推奨されています。

クロマチン免疫沈降 (ChIP) キットには、次のような試薬が入っています:

- コントロールDNA
- 希釈、洗浄、インキュベーションなどに用いるバッファー

内容: 低塩濃度バッファー、高塩濃度バッファー、LiCl溶液、Tris-EDTA、EDTA溶液、NaCl溶液、Tris-HCl、SDS溶解バッファー

さらに、抗アセチルヒストンH3またはH4など、対象の標的に特異的な抗体が必要となります。

(41ページ参照)

図 8.

クロマチン免疫沈降法のワークフロー

3.3.2 クロマチン免疫沈降法

このステップの目標は、適切な抗体を用い、前のステップで調製されたクロマチン抽出液から、標的のタンパク質／DNA複合体を分離することです。

適切なChIP抗体の選択は、ChIP実験の成功の鍵を握る最も重要なステップの1つです。通常のウェスタンブロットにおいて非常に良好に機能する高品質な抗体であっても、ChIPには適さない可能性があります。実際にChIPにおいて検証済みの抗体(例、ChIPAb+™検証済み抗体)以外は使用しない方がよいでしょう。特に品質管理や、ChIPでの機能の実証が行われていない抗体を用いる場合は実際のChIP実験のために1種類の抗体を選択する前に、いくつかの抗体を評価することをお勧めします。以下は、抗体を選択する際に考慮すべきパラメータです。

モノクローナル抗体 vs. ポリクローナル抗体

モノクローナル抗体とポリクローナル抗体はいずれもChIPに用いることができます。モノクローナル抗体は、標的タンパク質の特定のエピトープを認識します。モノクローナル抗体は高度に特異的であり、非特異的結合の傾向が少ないという利点があります。また、クローンに由来する性能のばらつきが少ないため、バッチ間の再現性が高くなっています。しかし、モノクローナル抗体によって認識されるエピトープが遮蔽されていたり、プロトコールの上流のステップで架橋などの変化が生じていたりする場合、モノクローナル抗体を用いて、標的タンパク質や関連するDNA配列を単離することはできません。経験的には、遮蔽がモノクローナル抗体の性能に影響を及ぼすことはほとんどないことが知られています。

対照的に、ポリクローナル抗体は標的タンパク質の複数のエピトープを認識します。このため、仮にいくつかのエピトープが架橋によって遮蔽されていても、ポリクローナル抗体は有効である場合があります。しかし、ポリクローナル抗体は複数のエピトープを認識するため、非特異的結合が起こる可能性が高くなっています。また、抗体の精製に用いる血清が、調製や精製の前にプールされていない限り、ポリクローナル集団の特異性が、免疫化の間に経時的に変化する可能性がある点についても考慮することが重要です。同様に、市販されているほとんどのポリクローナル抗体は、バッチ間で性能が異なっている可能性があります。ばらつきの程度は、販売業者の製造・品質管理基準によって異なります。例として、修飾に対するポリクローナル抗体では、利用可能な血清の量は限られています。

モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体のいずれを選択するとしても、ChIPのために市販の抗体を選択する際には、特異性を示すデータならびにChIPやその他の主要なアプリケーションにおける信頼性の高い成績を示すデータがある抗体が理想的な抗体となります。

需要が高い抗体は、頻繁に再製造する必要があり、これはホスト動物の免疫化から始まります。結果として、これらの抗体の特異性や親和性が、バッチによって異なる可能性があります。弊社の様な大規模な抗体の製造業者は、複数の動物に免疫化を実施し、適切な親和性および特異性を示す材料をスクリーニングおよびプールすることによって、この問題に対処することが可能です。均一性を保証するため、最終的な抗体の性能を、過去のバッチと比較することができます。

💡 テクニカルヒント

- ChIP実験のためにモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体のいずれを選択した場合でも、個々の解析について、抗体の希釈率を最適化しなければなりません。抗体を過剰に用いた場合、標的タンパク質の免疫沈降には成功するかもしれませんが、非特異的結合が高くなったり、特異的なシグナルが低下したりする可能性があります。対照的に、抗体が少なすぎる場合には、標的の回収率が低くなる傾向が多いようです。
- 最良の結果を生むChIP抗体は、特性が詳細に明らかで、標的タンパク質に結合することが実証されており、特異性について厳密に試験されている必要があります。理想的には、ChIPにおいて検証済みであるものが望ましい抗体です。
- ある抗体がウェスタンブロットにおいて良好に機能したとしても、クロマチン免疫沈降法において同様であるとは限りません。変性したタンパク質を検出するウェスタンブロットとは異なり、ChIP抗体は、非変性状態の標的タンパク質を認識するものでなければなりません。

ChIPのコントロール抗体

クロマチンは、核酸に結合したタンパク質の混合物です。結果の有効性を保証するため、ChIP実験には、抗体、免疫沈降ビーズ、ChIPによって得られた解析対象のDNAに対するクロマチンの非特異的結合に関するコントロールを含める必要があります。また、ChIP抗体の特異性を管理するため、ChIP実験に以下のコントロールを含める必要があります：

- 陰性コントロール抗体：ChIP抗体と同一の種およびフォーマット（例、精製済み血清や、未処理の血清、腹水）の陰性コントロールIgGを用いましょう。例として、正常な精製済みのマウスモノクローナルChIP抗体を用いる場合には、正常な精製済みのマウスIgGを陰性コントロールとして使用します。精製済みのウサギポリクローナルChIP抗体を用いる場合には、正常な精製済みのウサギIgGを陰性コントロール抗体として使用します。また、適切な陰性コントロールIgGが利用可能でない場合には、「抗体なし」またはビーズのみのアプローチを選択してもよいでしょう。対応するIgGの方が優れた陰性コントロールとなることが多いものの、濃縮倍率の計算では、陰性コントロールIgGまたはビーズのみのコントロールのいずれかを用いることができます。
- 陽性コントロール抗体：RNAポリメラーゼIIやヒストンサブユニット（通常H3またはH4のN末端）など、豊富に存在する標的タンパク質を認識するChIP抗体と同一種由来の抗体を用います。陽性コントロール抗体は、ChIP抗体の選択の影響を受けない実験の別の側面を検証する助けとなり、実験のトラブルシューティングにも有用な場合があります。

特異性試験

抗体を選択する前に、対象の抗体の特異性を理解することが重要です。これは、修飾ヒストンなどの翻訳後に修飾されるタンパク質を標的とする抗体を用いて作業する場合に、特に重要となります。使用する抗体が、特定の修飾部位を含有するエピトープしか検出しないことを確認することが重要です。抗体の特異性を評価するには、ドットプロット、ペプチドマイクロアレイ、ペプチド阻害アッセイなどの複数のアプローチがあります。特に修飾されたヒストンペプチドに対しては、類似したエピトープ（同一のヒストンサブユニットのジメチル化物とトリメチル化物など）との交差反応性を適切に評価するため、多数の検証方法を実施する研究室もあります。ヒストン抗体の特異性を試験する信頼性の高い方法としては、AbSurance™ Histone Antibody Specificity Array（カタログ番号16-665、16-667、16-668）をお勧めします。これらのアレイでは、ヒストンH2、H3、H4の合計89種類の高品質なペプチドを、PVDFメンブレン上のスポットとして提供しています。アッセイは、単純なウェスタンブロットの様な手順からなっており、標準的な化学発

光検出システムを利用します。また、マイクロアレイをベースとしたアプローチとは異なり、検出に追加的なソフトウェアや高価な装置は必要ありません。

検証試験

理想的には、抗体をChIPで検証します。しかし、ChIPのデータがない場合でも、必ずしもその抗体がChIPでは機能しないというわけではありません。ChIP試験のために抗体を選択する際は、その抗体について利用可能なすべてのアプリケーションデータを考慮しましょう。通常は、データがあるアプリケーションが幅広いほど、抗体がChIPで良好に機能する可能性が高くなります。例えば、免疫沈降法（IP）、免疫蛍光法（IF）、または免疫組織化学法（IHC）において検証済みの抗体の方が、ウェスタンブロットでしか検証されていない抗体よりも、ChIPで正の結果を供する可能性が高くなります。しかし、これらのアプリケーションにおいて検証されていても、その抗体がChIPで良好に機能することは保証できません。なぜなら、ChIP抗体は、ChIPでよく用いられる架橋法の影響を受けない、到達可能なエピトープを認識しなければならないからです。

💡 テクニカルヒント

免疫細胞化学、ウェスタンブロット、および／または免疫沈降法で機能するChIP抗体の候補を選択しましょう。このようなその他のイムノアッセイにおいて十分な成績が得られている場合は、ChIPにおいても機能する可能性が高くなります。それでも、ChIPにおいて確実に機能するという保証はありませんが、候補抗体に優先順位を付け、あまり望ましくない抗体を除外する助けになります。

ChIP抗体の応用

ChIP抗体は、アガロースや磁気ビーズに直接結合するか、プロテインAまたはプロテインGビーズ、あるいはプロテインA/Gビーズブレンドに固定します。本来のChIPのプロトコルでは、アガロースビーズが用いられていますが、長期間ChIPを実施している研究者の多くは磁気ビーズに移行しています。磁気ビーズでは、磁気分離デバイスを用い、未精製のクロマチン混合物からタンパク質／DNA複合体を迅速に単離することができます。

アガロースビーズは、多くの研究者によって良好に用いられており、安価ですが、時間のかかる選択肢となっています。これらのビーズは、分離に遠心分離が必要で、非特異的結合を示す場合があるため、ブロッキングや細胞溶解液の事前精製などが必要となる場合もあります。

ビーズの種類を選択は、実験に使用する予定の抗体の種類に依存して決まることが多いです。プロテインAビーズは、ウサギポリクローナル抗体に高い親和性を示しますが、プロテインGビーズは、すべてではありませんが、ほとんどのクラスのマウスモノクローナルIgGを含む多様な抗体に結合します。プロテインA/Gブレンドは、プロテインAとプロテインGの両方の結合特性が合わさっていることから、使用可能な抗体の種類という点では最も柔軟な選択肢です。弊社の研究・開発チームによって、プロテインA/Gブレンドを用いると、プロテインAまたはGを単独で用いた場合よりも、バックグラウンドが少なく、免疫沈降法の効率を損なうことなく、広範な抗体に使用可能であることが認められています。

どのビーズを選択するかに関わらず、磁気またはアガロースビーズをChIP反応に適用する順番が、ChIPシグナルに影響を及ぼす可能性があります。1つの方法としては、ビーズを捕捉抗体でインキュベーションし（室温で数時間、または

4℃でオーバーナイト）、クロマチンを加えてからさらにインキュベーションします（4℃で回転しながら1時間からオーバーナイト）。インキュベーション時間を延長すると、バックグラウンドシグナルとChIPシグナルの両方が増加する可能性があります。一般的に、標的に対する親和性が低い抗体は、長時間（オーバーナイト）のインキュベーションを行わないと、著しいChIPシグナルを示すことはありません。別の方法として、一部のプロトコルでは、抗体をクロマチンとインキュベーションし、その後ビーズを添加するか、3つすべてを同時に添加するなどの方法が用いられています。3つすべてを同時に添加する方法も機能する場合が多く、全体的な反応の実施に必要な時間が短縮されます。

3.3.3 ChIPテクノロジーにおける進歩

エピジェネティック修飾は、表現型の決定においてDNA配列と同様に重要であり、その研究では、従来の遺伝学的アプローチに対し、タンパク質 - DNAの相互作用に焦点が当てられています。これらのエピジェネティックパターンや制御ネットワークの機能解析は、標準的なクロマチン免疫沈降法 (ChIP) をベースとする技術を越えて進歩しており、ChIP-チップ、ChIPにより単離されたDNAのゲノムワイドマイクロアレイ分析、ChIP-シーケンシング (ChIPの後に、免疫沈降したDNAのシーケンシングを行うもの) などがあります。

このようなハイコンテントアプローチは、転写因子やヒストンサブユニットといった調節・構造タンパク質が、ゲノムとどのように相互作用をするかを明らかにします。これらのタンパク質 - DNA複合体を、翻訳後修飾に選択的な高品質の抗体によって免疫沈降し、シーケンシングやマイクロアレイと組み合わせることで、配列特異的なDNA結合部位を高解像度で同定することができます。

磁気ビーズ

利点

- 非特異的結合が少ない
- ブロッキングや事前精製が不要
- 洗浄中の取扱いが簡単
- チューブ内のビーズが見える
- 再現性の高い結果

欠点

- 若干コストが高い
- 磁気ラックが必要
- 非多孔（結合能はビーズの表面積に依存する）

アガロースビーズ

利点

- 結合能が高く（多孔性）、そのため非特異的結合も多い可能性がある
- 必要とする装置が少ない（遠心分離またはろ過）
- 若干コストが低い

欠点

- ブロッキングが必要
- 事前精製が必要
- チューブ内で見えない
- 取扱い中にビーズが失われる確率が高い

3.3.4 トラブルシューティング:

問題	考えられる原因	推奨されるステップ
陰性コントロール (IgGまたはモックによるIP) サンプルのバックグラウンドが高い	過剰な抗体によって標的以外への結合が生じている	抗体の濃度を最適化します。
	ビーズへの非特異的結合	ビーズの事前洗浄を実施するか、またはブロッキング剤をビーズに添加します。
	クロマチンの断片化が不完全である	断片化工程を最適化し、クロマチンの長さを200~1,000 bpにします。各細胞や組織の種類について、それぞれ断片化を最適化します。シリコン処理したチューブ、または低吸着チューブを用います。
	試薬が汚染されている	すべての試薬が新しく調製されており、夾雑物を含有していないことを確認します。洗浄回数を増やします。 サンプルに核酸が混入していないかどうかを判定するために、「DNAなし」でPCR反応を実施します。
「DNAなし」のPCR反応でシグナルが認められる	試薬が汚染されている	PCR専用のピペットを用い、PCRのセットアップ前にピペットをUV照射します。
		ChIP、DNA精製、PCR反応のセットアップを、それぞれ別の3室／区域で、専用のピペットを用いて実施するか、反応をフード内でセットアップします。
		ボトルに入った水など、事前に包装された水の使用は避けます。UV光源を備えたシステムから新たに供給されたMilli-Q®水を用います。
		エアロゾル耐性ピペットチップを用います。
		増幅したPCR産物を含有するチューブは、その後ChIPまたはqPCR実験を実施する場所の近くでは開封しないようにします。
DNAの回収率が少ない	ChIP抗体が無効、または親和性が低い	ChIPにおいて検証済みの抗体を用いていることを確認しましょう。ChIP抗体を用いている場合は、抗体のインキュベーション時間を延長します。
	ChIP抗体が不十分である	通常、ChIP抗体は1~10 µgで十分です。しかし、抗体の必要量は、標的タンパク質の相対的な存在量や、標的に対する抗体の親和性によって異なる場合があります。
	初期サンプルが不十分である	架橋前に、細胞数を判定するために別のプレートを調製します。1反応あたりの細胞数を再評価します。特に存在量が少ない標的を検出しようとしている場合には、細胞数を増やします。
	細胞溶解が不完全、または断片化が無効である	パラメータを変え、クロマチンの回収率に対する影響を評価することによって、これらのステップを最適化します。細胞溶解を改善するため、ダウンス型ホモジナイザーやガラスビーズなどの機械力を用います。断片化のステップを最適化し、泡沫化を避けます。
	架橋が過剰である	ホルムアルデヒド中で長時間インキュベーションすると、ChIP抗体による認識に必要なエピトープが遮蔽されてしまう恐れがあります。モノクローナル抗体を用いている場合、これは特に問題となります。過剰な架橋によって、超音波処理に耐性がある複合体が形成されてしまう場合もあります。架橋のステップを最適化します:ホルムアルデヒドの最終濃度は1%とし、実験を進める前に、最も有効な架橋時間を判定する必要があります。
	架橋が不十分である	架橋が不十分であると、プロトコールのその後のステップにおいて標的タンパク質がDNAから解離してしまう場合があります。ヒストンやヒストン修飾を研究しているのではない限り、標的タンパク質とDNAの結合を安定化するために、X-ChIPプロトコールを用いる必要があります。架橋時間を延長します。
	親和性が低い、またはビーズの品質が低い	プロテインG磁気ビーズは、マウスモノクローナル抗体を含む広範な抗体に結合します。抗体を最も柔軟に選択するためには、プロテイン A/G ブレンド (カタログ番号16-663) をお勧めします。
	PCRプライマーのプライミング効率が低い	プライマーの効率を試験します。適切なコントロールを用い、必要に応じてプライマーを設計し直します。

3.3.5 よくある質問:

質問	回答
モノクローナル抗体とポリクローナル抗体のどちらを用いるべきでしょうか？	モノクローナル抗体とポリクローナル抗体のいずれもChIPに用いることができます。モノクローナル抗体は、高度に特異的であることが多いですが、架橋条件に敏感な場合もあります。架橋が過剰であると、標的エピトープが遮蔽されてしまう恐れがあるため、架橋を注意深く最適化する必要があるかもしれません。ポリクローナル抗体は、過剰な架橋などの条件にあまり敏感ではなく、同様なモノクローナル抗体よりも良好に濃縮可能である場合があります。しかし、ポリクローナル抗体は、非特異的標的に結合しやすくなっています。
どうすれば選択した抗体がChIPで機能する可能性を高めることができますか？	抗体によって認識されるエピトープを検出するために、特異性／交差反応性を試験しましょう。ウェスタンブロット、免疫細胞化学、免疫沈降法などの複数の免疫アッセイにおいて抗体を試験する必要があります。その後、ChIPにおいて、その抗体を用い、標的のDNAが良好に濃縮されるかどうかを確認します。
抗体の使用量はどれくらいですか？	標的タンパク質の存在量や、標的に対する抗体の親和性によって、2～10 µgのChIP抗体を用いることをお勧めします。抗体の量を増やせばシグナルも強くなるとは限りません。最良のChIPシグナルを得るためには、抗体の力価を適切に設定することが推奨されています。
市販のChIP抗体は、どのように選択すればよいですか？	複数の特異性／交差反応性試験に合格しており、ChIPや複数の免疫アッセイにおいて検証済みの抗体を選択しましょう。ヒストン抗体のスクリーニングには、AbSurance™ histone antibody specificity Array (カタログ番号16-665、16-667、16-668) をお勧めします。
実験に適切なChIP抗体がない場合、タグの使用は推奨されていますか？	ChIPにおけるタグ抗体の使用は、抗体が利用可能でない場合、ばらつきがある場合、架橋されたクロマチンにおいてエピトープが遮蔽されている場合に良い方法です。タグが転写因子の機能に干渉する可能性がありますので、それぞれのケースでタグを評価する必要があります。N末端とC末端でタグを切り替えると、良いコントロールになる場合もあります。
優れたコントロール抗体とは何ですか？	ChIP抗体と同一の種に由来する正常なIgGを用いることをお勧めします。もしマウスモノクローナル抗体を使用するならば、正常なマウスIgGをお勧めします。
プロテインA／Gビーズブレンドを用いる利点は何ですか？	多数の抗体が、プロテインAおよびGの両方に結合しますが、親和性や特異性はそれぞれ異なります。プロテインAとGビーズを混合することによって、どちらか一方を選択したり、最適化のために両種に対する結合を評価したりする必要性がなくなります。ほとんどの場合において、プロテインA／Gビーズブレンドを用いると、純粋なプロテインAまたはプロテインGビーズを同量用いた場合よりも良好な濃縮が得られ、バックグラウンド活性が減少することが認められています。
正常なIgGコントロール抗体について、許容可能なインプット率(%)の範囲はどれくらいですか？	IgGプルダウンには相当なばらつきがあり、qPCRアッセイによって異なる場合もあります。同一のモックIgGサンプルでも、アッセイデザインの配列組成によって、ゲノムの別々の場所ではインプット率(%)の結果が異なる場合があります。シグナルは、チューブ、ビーズ、抗体に対する核酸の非特異的結合によるものである場合もあります。ChIPは相対的なもので、特定のインプット率(%)に適合させるための試みは避ける方が良いでしょう。しかし、理想的には、モックIgGサンプルのCt値が、標準曲線において最も希釈されたサンプルに近い値である必要があります。同様に、ChIPは相対的であることから、ChIPシグナルがIgGシグナルよりも高い場合には(アッセイのばらつきの範囲内で)、ChIPの結果が陽性となります。

知っておくと便利なテクノロジー

信頼性の高い結果を簡便に

Chromatin Immunoprecipitation Kits:

ChIPキットは、すぐに使える信頼性の高いChIPアプローチです。弊社では、磁気ビーズならびにアガロースビーズの両方に基づく多様なChIPキットを提供しています。磁気ビーズは、処理に磁気分離デバイスを用います。使いやすく、インプットしたビーズを良好かつ確実に回収できることから、ChIPを実施する実験室は、一般的に磁気ビーズを選択しています。

Magna ChIP™ Kitには、以下が含まれています:

- ChIPで機能することが実証済みの最適化・品質管理された試薬の完全なセット
- 細胞や組織に対する詳細なプロトコール
- 時間を節約: 試薬の調製、幾度もの検証実験、トラブルシューティングのための実験が不要になります
- 磁気ビーズを用い、1日でChIPを完了可能な迅速なプロトコール
- 単一のプレートで、最高96回のChIP反応を1回で実施可能な進化したプロトコール
- 陽性および陰性コントロール; EZ-Magna ChIP™ kitとEZ-ChIP™ kitには、IgGコントロールと、優れた設計のqPCRプライマーが含まれています
- マイクロアレイやChIP-シーケンシング分析のためのゲノムワイドキット
- 専門家によるテクニカルサポートやトラブルシューティング

製品名	カタログ番号
Magna ChIP™ A/G Kit	17-10085
EZ-Magna ChIP™ A/G Kit	17-10086
Magna ChIP™ HT96 Kit	17-10077
EZ-Magna ChIP™ HT96 Kit	17-10078
Magna ChIP-Seq™ Chromatin Immunoprecipitation and Next Generation Sequencing Library Preparation Kit	17-1010
Magna ChIP™ Universal Chromatin Immunoprecipitation DNA Microarray Quad Kit	17-1004
Magna ChIP™ G Tissue Kit	17-20000
ChIP Assay Kit (Agarose)	17-295
EZ-ChIP™ Kit (Agarose)	17-371

3.4 ウェスタンブロット

- 主要なステップ
- 3.4.1 はじめに
 - 3.4.2 サンプル調製
 - 3.4.3 ゲル電気泳動
 - 3.4.4 メンブレントランスファー
 - 3.4.5 非特異的結合の阻害
 - 3.4.6 抗体の添加
 - 3.4.7 検出方法
 - 3.4.8 よくある間違い
 - 3.4.9 トラブルシューティング
 - 3.4.10 メンブレンの選択に関する注意

3.4.1 はじめに

ウェスタンブロット (WB) は、ゲル電気泳動の分解能を、抗体検出の特異性と組み合わせたものです。ブロット法は、抗原の有無や量の検出、抗原の分子量、抗原の抽出効率など、タンパク質抗原の多数の重要な特性の確認に用いることができます。不溶性の抗原、標識が困難な抗原、容易に分解されてしまうため、免疫沈降法などの手順には適用不可能な抗原を取り扱う場合、この方法は特に有用です。

サイズ、電荷、形状などの異なるポリペプチドの特徴的な物理特性を利用し、サンプルを電流下でゲルマトリックスに泳動することによって、タンパク質の混合物をクロマトグラフ的 (電気泳動的) に分離することができます。このような方式でタンパク質を分離するために用いられる一般的な技術はSDS-PAGEです。「ゲルに流す」ことで、タンパク質の特性について多くを知ることができますが、分画されたタンパク質サンプルを、ゲルから固体支持メンブレン (ブロット) に移し、特異抗体を用いて検出することで、さらに多くの情報を取得できます。ウェスタンブロットは、ライフサイエンス研究において非常に一般的な手順となっています。ウェスタンブロット上のタンパク質の検出に高品質な抗体を用いることは、実験の成功に非常に重要です。

ウェスタンブロットは、探索的研究に際して最も一般的に選択されるプラットフォームであり、抗体やその他のタンパク質を検出するための新規のアッセイ (ELISA、ビーズをベースとしたアッセイ、フローサイトメトリー、免疫組織化学など) を評価する際には、依然として評価基準として用いられています。新しいテクノロジーの開発によって、ウェスタンブロットのシグナル・ノイズ比を改善するツールが得られており、ウェスタンブロットに要する時間も大きく短縮されています (例、弊社のSNAP i.d.® 2.0 system、カタログ番号SNAP2BASE)。

基本的なウェスタンブロットは、以下の主要なステップからなっています：

- サンプル調製
- ゲル電気泳動

- メンブレントランスファー
- 非特異的結合の阻害 (ブロッキング)
- 抗体の添加
- 検出方法

以下のガイドラインでは、最適化された工程を開発するためのスタート点となる工程について説明しています。

3.4.2 サンプル調製

未標識のタンパク質溶液は、細胞または組織の抽出液であることが多いですが、まずゲル電気泳動サンプル調製用バッファーで調製します (付録の有用な調製品の章を参照してください)。

場合によっては、ブロットするサンプルが、前述のとおり、免疫沈降法によって得られたものであることもあります。詳細は、第3.2.3章の免疫沈降法におけるサンプル調製を参照してください。



注意

ある程度の長さの疎水性アミノ酸を含有するタンパク質 (膜タンパク質など) は、沸騰すると凝集しやすいため、サンプルの煮沸は避けてください。

3.4.3 ゲル電気泳動

帯電したタンパク質は、電場において正味電荷に基づいて遊走します。しかし、分子が電流に反応してゲルマトリックス内を遊走する際のゲルマトリックスのふるい作用により移動する分子のサイズや形状に依存して、分子の移動性が減少します。

ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) は、個々のタンパク質を、サイズ、形状、電荷に基づいて、非変性条件下で分離するために利用されます。これは一般的にネイティブ PAGEと呼ばれます。非変性条件下において、一部のタンパク質の遊走は、二次構造や、より高次元の構造の保持による影響を受けます。これらの構造は、隣接したシステイン残基間の共有結合 (ジスルフィド結合) によって安定化されています。

PAGEは、変性条件下においても実施することができ、通常は、モル過剰量のイオン性界面活性剤であるドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を用いて実施します。これは一般的に SDS-PAGEとして知られています。

さらに、PAGEは変性・還元条件下においても実施することができます (ジチオスレイトール (DTT) やβ-メルカプトエタノールなどの還元剤を用いたSDS-PAGE)。

変性条件:

最も一般的には、ポリアクリルアミドゲル電気泳動をSDSを用いて実施します。サンプルをSDS-PAGEで分離する前に、サンプルを界面活性剤と共に加熱し、タンパク質を変性させます。加熱とSDSが非共有結合性の分子内および分子間結合を破壊することによって、タンパク質の二次構造や三次構造が効率的に失われます。結果として、変性タンパク質分子が、タンパク質1グラムあたり約1.2グラムのSDSによって均一に「コーティング」され、SDSの負電荷が、タンパク質分子を単位質量あたり正味としてマイナスに帯電させます。このため、変性SDS-PAGEによって分離したタンパク質サンプルは、その電荷に関わらず、主に相対的な分子量によって分離されることになります (幾分かは形状も関わっています)。

還元条件:

未処理のジスルフィド結合を有するポリペプチドは、SDS-PAGEにおいて異常な遊走を示すことがよくあります。SDS-PAGEによるこのようなタンパク質の異常分離は、タンパク質の電荷や形状に依存しています。これは、部分的には分子内または分子間のジスルフィド結合の形成に関与するタンパク質領域の立体障害がSDSの結合に影響し、分子の電荷の分布が不均一になるためです。また、ジスルフィド結合によって安定化された二次構造も、ゲルマトリックス内のタンパク質の遊走に影響を及ぼします。このような潜在的な問題を軽減するために、DTTやβ-メルカプトエタノールなどの還元剤をSDSサンプルバッファーに加え、ジスルフィド結合を破壊します。還元・変性条件下では、サンプル中のすべてのタンパク質が、サイズ (分子量) のみによってSDS-PAGEにより分離されることになります。このため、SDS-PAGEは一般的に還元条件下で実施されます。

💡 テクニカルヒント

- 検出対象の抗原の予測分子量に対し、ゲルのアクリルアミド濃度が適当であり、ゲル調製の直前にアクリルアミド溶液が脱気されていることを確認しましょう。
- ゲルをマニュアル調製している場合には、分離を最大にするため、必ず使用の前日にSDS-PAGEゲルを作製し、電気泳動時には、完全に重合しているようにしましょう。
- ゲルの重合の触媒には、新鮮なペルオキシ二硫酸アンモニウムとテトラメチルエチレンジアミン (TEMED) を使用しましょう。
- サンプルをロードする前に、ゲルのウェルを十分にすすぎましょう。
- 各ウェルのタンパク質量は1×SDS-PAGEサンプルバッファー中で、総細胞または組織溶解液であれば10~50 μg、精製されたタンパク質であれば0.1~1.0 μgが標準的です。
- サンプルを非変性または非還元条件下で泳動する場合には、サンプルバッファーにβ-メルカプトエタノールやDTTを入れないようにします。

👍 注意

染色済みの分子量マーカーの泳動は、サイズに忠実ではないことが多いようです。抗原の分子量を正確に測定する場合には、未染色の分子量標準品も泳動することをお勧めします。

💡 テクニカルヒント

- サンプルは、ゲルにアプライする前に、50~65°Cで10~15分加熱します。
- メンブレントランスファーのステップの間に、ゲルからメンブレンへのタンパク質のトランスファーをモニタリングするために、1つのウェルに染色済みの分子量マーカーを泳動しておくことで便利です。これは、トランスファーの際にゲルの向きを知る助けにもなります。
- 電気泳動装置の製造業者の規格に従い、サンプルをポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、分子量によってタンパク質を分離します。プロムフェノールブルー色素の先端がゲルの底に達した時点で、電気泳動を終了します。

3.4.4 メンブレントランスファー

SDS-PAGEによって分離したタンパク質は、ゲルからメンブレンにトランスファーされます。これは、キャピラリーブロッティングまたはエレクトロブロッティング(セミドライ・タンクトランスファーシステム)のいずれかによって実施することができます。

より効率的で、広範に用いられているトランスファー方法は、エレクトロブロッティングです。この手順では、ゲルとメンブレン(ニトロセルロースまたはフッ化ポリビニリデン[PVDF])をろ紙でサンドイッチしたものをカセットで圧迫し、2本の並行な電極の間になるようにバッファーに浸漬します。ゲルと直角に電流が流れ、分離したタンパク質が、ゲルからメンブレンに電気泳動されます。タンパク質がメンブレンにトランスファーされると、メンブレンは「ブロット」と呼ばれます。

特定の抗原がメンブレンにトランスファーされる効率は、使用したメンブレンのタンパク質結合能、適用したトランスファー方法や条件、抗原自体の性質に依存します。トランスファーの効率を最大化するために、標的抗原の物理特性に関する知識は有益となります。トランスファーの効率に関して、最も重要な特性は、抗原のサイズ(MW)と疎水性です。SDSは、電流に応じたゲルからのタンパク質の泳動の促進に必要ですが、タンパク質によるメンブレン自体への結合に干渉してしまう場合もあります(これは特にPVDFメンブレンで問題になることがあります)。小さなポリペプチドは速く泳動されるため、ゲルを離れてメンブレンに接触する際に、依然として相当量のSDSによってコーティングされており、メンブレンに対するタンパク質の結合効率が低下してしまう恐れがあります。

逆に、高分子量の抗原では、一般的により長いトランスファー時間が必要となります。

通常は、タンパク質が疎水性であるほど、メンブレンへのトランスファーが難しくなります。

タンパク質をゲルからメンブレンにトランスファーするためにはSDS-PAGEの後に、標準的なタンクトランスファーまたはセミドライブロッティングシステムを用いて、エレクトロブロッティングのためにゲルを調製します。一般的に、以下の層を順番に重ねたトランスファー「サンドイッチ」を構築します：

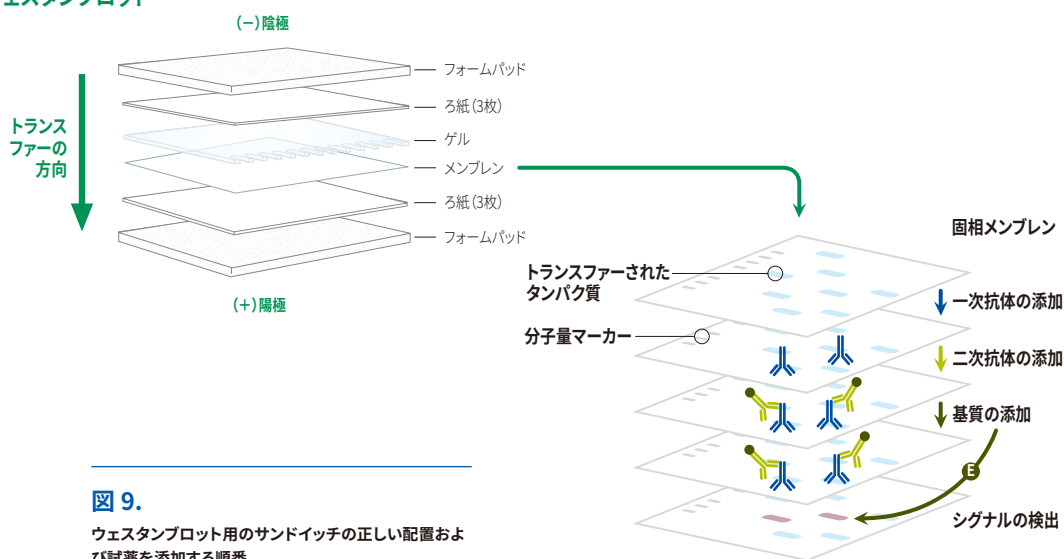
陰極(−)末端

- 1) スポンジまたはフォームパッド
- 2) トランスファーバッファーに浸漬したろ紙(3枚)
- 3) 分離済みのタンパク質を含むゲル
- 4) メンブレン(ニトロセルロースまたはPVDF)
- 5) トランスファーバッファーに浸漬したろ紙(3枚)
- 6) スポンジまたはフォームパッド

陽極(+)末端

このようなサンドイッチを構築し、トランスファーシステムに入れます。トランスファーは、ウェットトランスファーシステムでは、1アンペア(定電流)を1時間、またはその同アンペア時(Ah)、または25 mM Tris、190 mMグリシン、20%エタノール(オプション)をトランスファーバッファーとして用いたセミドライトランスファーシステムでは、0.7アンペアを45分適用することによって実施します。

ウェスタンブロット



💡 テクニカルヒント

- メンブレンとろ紙(6枚)を、ゲルに正確に合うように切断します。
- コンタミネーションを避けるため、メンブレンの取扱い中は常にグローブを着用することが重要です。
- トランスファーバッファーに浸漬したろ紙は、ゲルをガラスプレートまたはプラスチックカセットから注意深く外し、その後ゲルをメンブレンに移す際に用いることができます。
- ゲルとメンブレンの間にあるすべての気泡を取り除きます。ゲル／メンブレンのサンドイッチの表面上に、試験管やパストゥールピペットを転がすと、容易に気泡を取り除くことができます。
- トランスファー時間が長時間である場合には、過熱やバッファーの腐敗を避けるために、エレクトロブロットングを4°Cで実施することをお勧めします。

注：完全にトランスファーされたことを確認するために、ブロットをボンソー染色することができます。これがその後の免疫学的検出法に干渉することはありません。タンパク質のバンドを可視化するために、より感度の高いCoomassie®ブルーリリアントブルー色素やアミドブラック色素を用いることもできますが、これらの試薬はその後の免疫学的検出法に適合しない場合があります。

3.4.5 非特異的結合の阻害(ブロッキング)

タンパク質をメンブレンにトランスファーした後、抗体や検出法によって視覚化する前に、メンブレンに残っている疎水性結合部位をブロックするために、メンブレンを適切なブロッキングタンパク質溶液でインキュベーションしなければなりません。これによってバックグラウンドが減少し、一次抗体によるメンブレン自体への非特異的結合が防止されます。

👍 注意

ブロッキングバッファーに、一次抗体や二次抗体によって認識される可能性がある抗原が含まれていないことを確認しなければなりません。例として、抗リン酸抗体を用いる場合は、リン酸緩衝食塩水(PBS)ではなく、Tris緩衝食塩水(TBS)を用いましょう。これは、PBSが抗体に対して非特異的な免疫反応を示す恐れがあるためです。リン酸化特異的な検出のために特別に設計された、タンパク質を含有しないブロッキング剤(例、カタログ番号WBAVDP001)を用いると、リン酸化タンパク質検出中のバックグラウンドノイズを最小化できる可能性が高くなります。

ブロッキングバッファーの一般例:

- 10% (w/v) ウシ血清アルブミン (BSA)
- Trisまたはリン酸緩衝食塩水に溶解した5%脱脂粉乳(スキムミルク)
- バックグラウンドノイズの最小化によって、シグナル対ノイズ比を改善する場合があるタンパク質を含有しないBlot™試薬などのブロッキング試薬

ブロッキングバッファーで、37°Cで30分間、または室温で1時間インキュベーションすると、メンブレンが十分にブロッキングされます。

3.4.6 抗体の添加

一次抗体を、Trisまたはリン酸緩衝食塩水で希釈します。非特異的な反応が認められる、または予測される場合を除き、一次抗体にブロッキングタンパク質を添加する必要はありません。ブロットからブロッキングバッファーを移し替えた後、メンブレンを希釈した一次抗体と37°Cで30分間、室温で1時間、または4°Cでオーバーナイト、緩やかに攪拌しながらインキュベーションします。推奨される希釈範囲については、個々の製品のデータシートをご参照ください。一次抗体とインキュベーションした後、二次抗体を添加する前に、ブロットを洗浄バッファー(0.1% Tween® 20を加えたTrisまたはリン酸緩衝食塩水)を変えながら数回洗浄します。その後、上記と同様にメンブレンを標識二次抗体とインキュベーションします。

3.4.7 検出方法

検出方法は、一次(または二次)抗体に結合した標識によります。

ウェスタンブロットで最も一般的に用いられる抗体標識は、アルカリホスファターゼやホースラディッシュペロキシダーゼなどの酵素で、化学発光基質を用いた発光反応、または発色基質(色素原)を用いた発色反応のいずれかを触媒します。化学発光シグナルは、ブロットをX線フィルムに露光することによって検出可能となりますが、発色シグナルは視覚的に検出することができます。

蛍光検出では、酵素活性部位で蛍光を発する蛍光プローブ標識抗体または蛍光発生基質のいずれかを用います(化学蛍光)。この方法の利点の1つは、蛍光シグナルは長期間安定であるため、ブロットを保管し、再度画像化することができるという点です。また、多様な蛍光プローブが利用可能であるため、単一のサンプルから、複数のタンパク質標的を同時に検出することが可能です(マルチプレックス検出)。

化学発光法などの一部の抗体検出システムは非常に感度が高いのに対し、発色基質を用いるものなどでは感度が低くなっています。

一次抗体の適切な作用濃度は、一次抗体の結合特性によって異なり、これは使用する検出システムの種類によって大きく左右されます。

発色検出システムに適切な一次抗体の希釈率を、最適化せずに化学発光検出システムに当てはめた場合、高いバックグラウンドノイズが認められることがよくあります。このような感度の高い検出システムでは、至適な希釈率を判定するため、追加的な一次抗体の希釈系列を作製する必要があります。同様に、化学発光検出システムに適切な一次抗体の希釈率を、発色検出システムに用いると、検出不能な低いシグナルしか認められない可能性があります。

その他の標識済抗体には次のようなものがあります：

1. 写真フィルムを用いて検出可能な¹²⁵I-標識二次抗体。
2. ¹²⁵I-標識プロテインA。この場合、二次抗体の代わりに、IgG分子のFc領域に結合するプロテインAが用いられます。
3. 金標識二次抗体。微小な金粒子は、二次抗体が一次抗体に結合すると、赤色として直接に目に見えるようになります。
4. ビオチン標識二次抗体。この場合、プロットを二次抗体とインキュベーションし、その後ビオチンに強力に結合する酵素標識アビジンとインキュベーションします。このシステムでは、単一の抗体分子に複数のビオチン分子を結合可能であるため、高いシグナルが得られます。よく用いられる酵素は、アルカリホスファターゼやホースラディッシュペルオキシダーゼです。

異なる基質を用いた検出法に関する特異的なプロトコールについては、製造業者のユーザーガイドやデータシートを参照してください。

ご存知ですか？

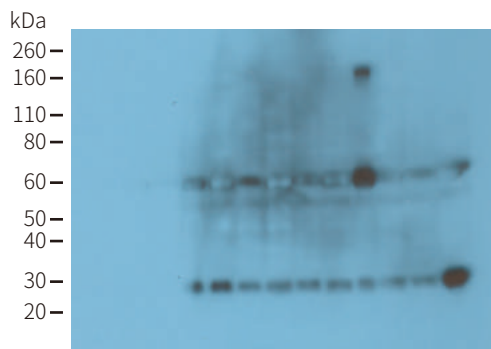
目的とするタンパク質の下に余分なバンドが現れた場合は、目的とするタンパク質がタンパク質分解を受けている可能性が高いでしょう。これは、組織または細胞サンプルの調製中に、サンプルをプロテアーゼ阻害剤で処理することによって防止することができます。また、サンプルバッファーに十分なSDSおよび／または還元剤（DTT、2-メルカプトエタノール、BMS）が含まれていない場合、タンパク質がそのサブユニットから完全に解離しないままで、還元、または変性されてしまう可能性があります。この場合は、ゲル上の目的とするタンパク質の上に余分なバンドが現れてしまうのです。泳動の直前に、サンプルをサンプルバッファーと混合して、65℃で10～15分間加熱すると、このような非共有結合性の相互作用やジスルフィド結合の影響を軽減することができます。DTTや2-メルカプトエタノールの代わりに、TCEPなどの不可逆的な還元剤の利用が有効な場合もあります。

時に、一次抗体がサンプル中の本来の標的ではないエピトープを特異的に認識することによって、バンドが現れることもあります。例として、BSAに結合したペプチドに対して作製された抗体は、サンプル中の微量のBSAを認識してしまう場合があります。相同タンパク質も抗体によって認識される可能性があります。ポリクローナル血清を使用する場合は、動物がその生涯で同様な抗原に曝露した際に産生された抗体の存在によって、複数のバンドが現れる可能性もあります。どのような抗体であっても、その特異性を判定するため、正常な血清コントロールを含めることが最良の方法です。

3.4.8 よくある間違い

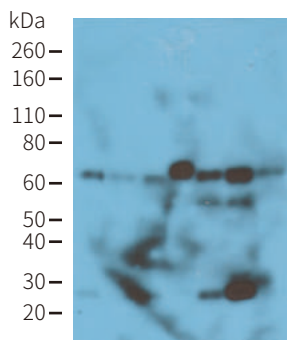
ウェスタンブロットにおいてよく認められるアーティファクトには、次のような例があります：

例 1:



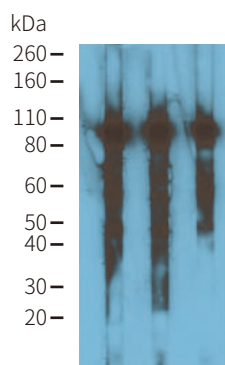
泳動したゲルの「スマイリング」。これは電位が高すぎるために起こります。また、標的のバンドが褪色していますが、これは使用した検出試薬の濃度が高すぎるのが原因です。バックグラウンドが高すぎる場合は、一次および/または二次抗体の濃度が高すぎるのが原因です。

例 2:

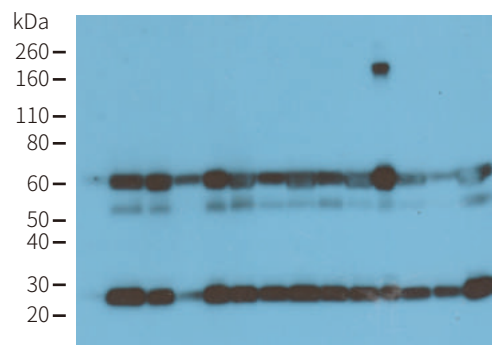


バックグラウンドが高すぎる例。このブロットは適切に洗浄されていません。

例 3:



明らかなバンドではなく、スミアが認められます。これは各ウェルに泳動したサンプル中のタンパク質量が多すぎるのが原因です。



褪色したバンドが認められます。化学発光基質の濃度が高すぎた、または露光前のインキュベーションが長すぎたことが原因です。(標的は180 kDa、褪色したバンドは約60 kDaで認められます。)

3.4.9 トラブルシューティング:

問題	考えられる原因	解決法
プロットが縞状になっている	ゲルに泳動したタンパク質が過剰である	タンパク質濃度を正確に測定し、泳動するタンパク質の量を減らします。
プロットが不鮮明、またはぼやけている	ゲルの平衡化が不適切であり、プロット中に縮んでしまった	ゲルの平衡化時間を確認します。
シグナルが検出されない	抗原が不十分である	ゲルに泳動する抗原を増やすか、または泳動前にサンプルを濃縮する、またはゲルに泳動する標的タンパク質の量を増やすために免疫沈降法を用います。
	抗原が破壊されている可能性がある	電気泳動用の処理によってサンプルの抗原性が破壊されていないか確認します。
	メンブレンのストリッピングおよびリプロービングが行われている	リプロービング中に抗原が失われている可能性があります。
	一次抗体の親和性が低い	バッファーから Tween® を除きます。
	二次抗体が間違っている	適切な二次抗体であるか確認します。
	検出前のプロットの保存中にタンパク質が分解されてしまった	新鮮なプロットを用います。
	検出システム	一次抗体の濃度、インキュベーション時間、および温度を最適化します。
		特定のアプリケーションに際して、試薬濃度を上げインキュベーション時間を延長します（および最適化します）。
		検出試薬が適切に保存されており、指示どおりに使用されていることを確認します。
	露光時間が短すぎる	露光時間を延長します。
シグナルが弱い	化学発光基質の活性が失われてしまっている	少量の作業溶液（1 mL）を調製し、暗室で 1 mL の HRP 標識体を添加します。化学発光基質が正常であれば視覚可能な青い光が認められるはずです。
	「シグナルが検出されない」の項を参照ください	
	ゲル上のタンパク質量が不十分である	ゲルに泳動するタンパク質を増やすか、または泳動前にサンプルを濃縮する、またはゲルに泳動する標的タンパク質の量を増やすために免疫沈降法を用います。
		フィルムの露光時間を延長します（1～2 時間）。
		メンブレンへのタンパク質の転写不良が疑われる場合には、転写バッファーの pH、メンブレンの種類や電位などの転写条件を最適化します。
	タンパク質がメンブレンを通過してしまっている	目的タンパク質が低分子量（< 20 kDa）の場合、孔径 0.2 μm のメンブレン Immobilon-P SM （カタログ番号 ISEQ00010 他）を選択することをお勧めします。
	目的のタンパク質の量に対してブロッキングタンパク質が多すぎる（オーバーブロッキング）	ブロッキングタンパク質の濃度を下げます。濃度 5% のスキムミルクでは検出できなかったバンドが、0.5%、0.05% のもので検出できるようになることがあります。
非特異的なバンドがある	目的タンパク質に対する抗体の検出感度が低い	より高感度の検出試薬 Immobilon ECL Ultra Western HRP Substrate(カタログ番号 WBULS0100)、もしくはシグナル増強剤 Immobilon Signal Enhancer (カタログ番号 WBSH0500) を使用します。
	SDS による、固定されたタンパク質のバンドへの非特異的結合	転写後に、プロットを攪拌しながらよく洗浄します。
	抗体（一次または二次）濃度が高すぎる	手順で SDS を使用しない方法もあります。 抗体濃度を下げます。
バンドが拡散している	ゲルに泳動したタンパク質が多すぎる	泳動するタンパク質の量を減らします。
	抗体（一次または二次）濃度が高すぎる	抗体濃度を下げます。
バンドが白く抜ける（リバースウェスタン）	サンプルタンパク質量が多い サンプルが発現量の多いタンパク質、精製タンパク質の場合など	アブライするタンパク質量を減らします。
	HRP 標識二次抗体が多い	二次抗体濃度を下げます。
部分的に現像された区域や、何も無い区域がある	ゲルからのタンパク質の転写が不完全である	転写中にゲルとメンブレンの間にある気泡を取り除きます。
		ブロッキング前に、Ponceau S (カタログ番号 114275) で膜を染色してタンパク質の転写をチェックします。
		ストリッピング中にメンブレンが重なり合わないよう、メンブレンを別々にインキュベーションします。

問題	考えられる原因	解決法
ボンソー染色したブロットの染色が不良である	転写が無効である	ブロットイングサンドイッチを作製する際、丁寧に気泡を除去します。 エレクトロブロットイングの間に温度が過剰になり、気泡またはゲル／メンブレンの歪みが生じていないか確認します。
	ウェスタンブロット中にタンパク質が転写されなかった	機器（ボックス、トップ、電源）の設定を確認します。
ボンソー染色したブロットの染色が認められない	ゲルとメンブレンがブロット中に適切に接触していない	メンブレンがゲルの正しい面の上にあることを確認します。
	メンブレンの問題	手順を通して、メンブレンがしっかりと濡れたままであることを確認します。 すべてのインキュベーション中には攪拌するようにします。メンブレンの取扱いに気を付けましょう。メンブレンを傷つけると、非特異的結合が生じる恐れがあります。 メンブレンを素手で取り扱わないようにします。グローブを着用しましょう！ 常に清潔なグローブを着用するか、メンブレン用ピンセット（カタログ番号 XX6200006P）を用います。
バックグラウンドが高く、均一である	抗体（一次または二次）濃度が高すぎる	一次抗体または二次抗体のいずれかの希釈率を下げる、またはインキュベーション時間を短縮します。
	適切なブロッキング剤が用いられていない	別のブロッキング剤と比較します。
	非特異的部位のブロッキングが不十分である	ブロッキング剤の濃度を上げます。 ブロッキング時間および温度を最適化します。ブロッキング剤に Tween®-20 が含まれていない場合、Tween®-20 を添加します。Tween®-20 の濃度は 0.05% が推奨されています。
	抗体が、ブロッキング剤中のタンパク質と交差反応している	別のブロッキング剤を用います。一次抗体を、その他のタンパク質を含まないブロッキング剤で希釈します。 アビジン - ビオチンシステムを用いる場合は、メンブレンのブロッキングにスキムミルクは使用しません。 新しく調製したブロッキング剤を用います。
	露光時間が長すぎる	ブロットをフィルムに露光する時間を短縮します。 フィルムの露光時間を最短にします（最初の 15 秒の露光で十分な場合もあります）。露光時間が短すぎると不便である場合は、抗体濃度を下げます。 フィルムに再度露光する前に、ブロットをカセット内で 5～10 分放置します。
	洗浄が不十分である	洗浄回数や、使用するバッファーの容量を増やします。 バッファーに Tween®-20 が含まれていない場合、Tween®-20 を添加します。例えば、PBS-T（カタログ番号 524653）、あるいは TBS-T（カタログ番号 524753）を使用します。 ブロッキング剤の Tween®-20 濃度を 0.1% に上げます。 Tween®-20 含有バッファーでの洗浄でも不十分な場合、塩化ナトリウム（最大 0.5 M）および SDS（最大 0.02%）を添加した PBS あるいは TBS などのバッファーで、二次抗体反応後に 30 分間振とう洗浄を行います。
	バッファーのコンタミネーションまたは細菌の増殖	新鮮なバッファーを調製します。
	ブロッキング機器の汚染	すべての機器を清掃するか、交換します。
	抗体（一次または二次）濃度が高すぎる	抗体濃度を最適化します。一次／二次抗体の濃度が高すぎると、高いバックグラウンドが生じる場合があります。
	HRP 標識抗体の凝集の形成によって小斑点が生じる	標識抗体を、孔径 0.2 μm のメンブレン（カタログ番号 SLGVJ13SL）でろ過します。
	適切なブロッキング剤が用いられていない	別のブロッキング剤と比較します。
	非特異的部位のブロッキングが不十分である	ブロッキング剤の濃度を上げます。 ブロッキング時間および／または温度を最適化します。 ブロッキング剤に Tween®-20 が含まれていない場合、Tween®-20 を添加します。Tween®-20 の濃度は 0.05% が推奨されています。

3.4.10 メンブレンの選択に関する注意

ブロットに用いるメンブレンの種類によって、以下に影響が及ぶ可能性があります：

- ・タンパク質結合力
- ・アルコールで事前に湿潤する必要性
- ・複数回のストリッピングおよびリプロービングを伴う実験の実施能
- ・タンパク質の視覚化
- ・ブロットの長期保存
- ・シグナル／ノイズ比

ポリビニリデンフロライド (PVDF) およびニトロセルロースの2種類のメンブレン材質は、ウェスタンブロットで最も一般的に用いられているメンブレンです。

特性／アプリケーション	ニトロセルロース	PVDF
物理的強度	不良	良好
タンパク質結合力	80 – 100 µg/cm ²	100 – 300 µg/cm ²
アルコールや有機溶媒に対する化学適合性	No	Yes
ウェスタントランスファー	Yes	Yes
トータルタンパク質染色	金コロイド	金コロイド
	ボンソーSレッド	ボンソーSレッド
	アミドブラック	アミドブラック
	インディアインク	インディアインク
	Sypro® プロット染色	Coomassie® ブルー色素
検出方法	発色	発色
	化学発光	化学発光
	蛍光	蛍光
	放射性	化学蛍光・放射性
ダブルブロット法	No	Yes
迅速免疫検出法	No	Yes
ウェスタンリプロービング	Yes	Yes
Edmanシーケンシング	No	Yes
アミノ酸分析	Yes	Yes
SDSの存在下での結合	不良	良好
メンブレン上での断片化処理またはマスマスペクトル分析	No	Yes
直接的なMALDI-TOF MS分析	No	Yes
データの保存能	No	Yes

知っておくと便利なテクノロジー

ブロッティングの後がたった30分に 吸引式免疫反応システム

SNAP i.d.® 2.0 システム

ウェスタンブロット法をお使いのお客様のニーズに応えるために開発されたSNAP i.d.® 2.0 システムは、記録的なスピードで、高品質のブロットを作ります。独自の吸引駆動テクノロジーとビルトインのフローディストリビューターがメンブレンを通して試薬をよく反応させ、均一に広げることが可能です。2つのブロットホルダーサイズで、mini (7.5 x 8.4 cm)、midi (8.5 x 13.5 cm)、またはmultiblot (4.5 x 8.5 cm) (W x L) サイズのゲルに対応し、2つのブロットホルダーは並行して可動することもできます。迅速に実験条件を最適化し、タンパク質検出スループットを大幅に向上させることが可能です。

研究者には通常、ブロッティングプロトコルを最適化する十分な時間がありません。SNAP i.d. 2.0 システムはブロッティングや洗浄、抗体インキュベーションに必要な時間を30分に短縮することで最高の結果を得るための免疫検出の条件最適化に貢献します。

SNAP i.d. 2.0 システムの最新の追加構成品は免疫組織化学 (IHC) アダプターフレームです。ユーザーは同じ吸引システム (SNAP i.d. 2.0 本体) を用いてウェスタンブロットと免疫組織染色を実施できるようになります。

62ページもしくは右記アドレスをご覧ください。



製品名	カタログ番号
SNAP i.d.® 2.0 Protein Detection System-Mini (7.5 x 8.4 cm)	SNAP2MINI
SNAP i.d.® 2.0 Protein Detection System-Midi (8.5 x 13.5 cm)	SNAP2MIDI
SNAP i.d.® 2.0 Protein Detection System-Mini and MultiBlot (7.5 x 8.4 cm and 4.5 x 8.4 cm)	SNAP2MB1
SNAP i.d.® 2.0 Protein Detection System-Midi and MultiBlot (8.5 x 13.5 cm and 4.5 x 8.4 cm)	SNAP2MB2
SNAP i.d.® 2.0 Protein Detection -MultiBlot (4.5 x 8.4 cm)	SNAP2MB3

全ての構成品とオプションはこちらからお選びいただけます
www.merckmillipore.com/snap

3.5 酵素結合免疫吸着検査法 (ELISA)

- 3.5.1 はじめに
- 3.5.2 サンドイッチELISA
- 3.5.3 競合ELISA
- 3.5.4 基質
- 3.5.5 定量化
- 3.5.6 トラブルシューティング

3.5.1 はじめに

酵素結合免疫吸着検査法 (ELISA) は、抗体の特異性を、単純な酵素測定法の感受性と組み合わせた技術です。容易に測定可能で、ターンオーバー数が多い酵素を結合した抗体または抗原を用いることによって、ELISAで抗原または抗体濃度の有用な測定値を得ることができます。一般的に用いられているELISAのフォーマットは、サンドイッチELISAと競合ELISAの2種類です。これらを以下に図示し、説明します。

3.5.2 サンドイッチELISA

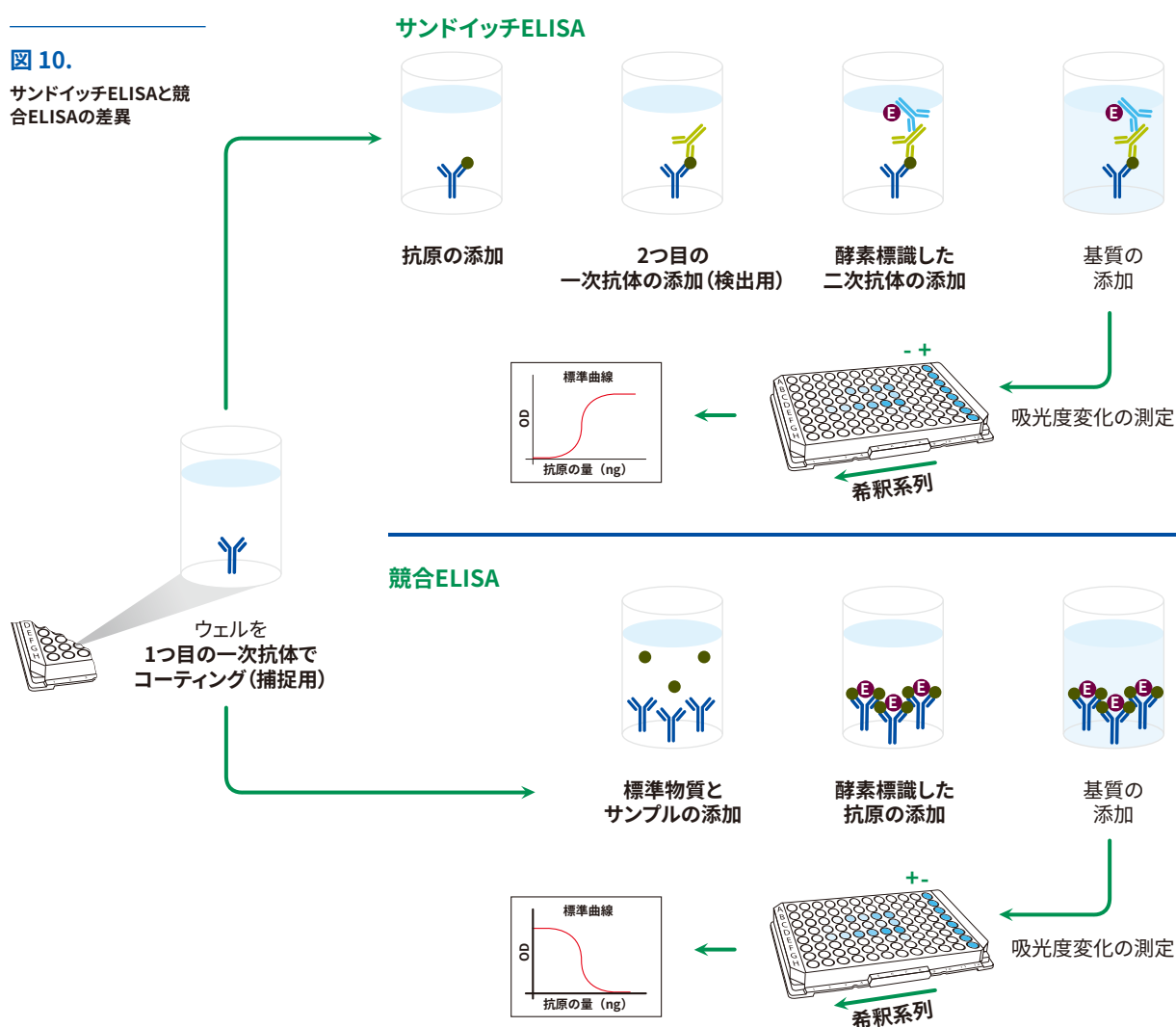
2つの抗体を用いるサンドイッチELISAは、未知のサンプル中における抗原濃度の測定に用いられており、最も有用なイムノアッセイ技術の1つとなっています。サンドイッチELISAは、迅速かつ正確で、精製された抗原の標準物質が利用可能であれば、このアッセイによって用量反応曲線を作成し、未知のサンプル中における抗原の絶対量を判定することができます。

このアッセイの実施にあたっては、以下の通り「サンドイッチ」を作製します：

- 精製された、標的に特異的な抗体（「捕捉」抗体）を、固相に結合します。通常は、プレートのウェルの底に接着します。
- サンプル（未知量の抗原を含有している可能性があるもの）を加え、結合した抗体と複合体を形成させます。結合しなかった生成物は、洗浄して除去します。
- 標識した2つ目の抗体（「検出」抗体）を加え、抗原に結合させます。

このアッセイでは、発色基質を使用し、マトリックスに結合

図 10.
サンドイッチELISAと競合ELISAの差異



した標識済みの2つ目の抗体の量を測定して定量化します。

この技術の主な利点は、使用前に抗原を精製する必要がなく、非常に特異的であるということです。

しかし、欠点もあり、すべての抗体がこのアプリケーションに使用可能なわけではありません。モノクローナル抗体の組み合わせは、「マッチドペア」、すなわち、抗原の別々のエピトープを認識し、互いの結合を邪魔しない組み合わせでなければなりません。

固相に結合する捕捉抗体の量は、抗体溶液を希釈したり濃縮したりすることによって容易に調節することができます。抗原に対する抗体の結合活性は、別の抗体と置換することによってしか変えられません。2つ目の抗体の比活性は、その抗体の標識部位の数や種類によります。

サンドイッチELISAの感度は、4つの要因に依存します：

1. 固相に結合した1つ目の抗体の分子数
2. 抗原に対する1つ目の抗体の結合活性
3. 抗原に対する2つ目の抗体の結合活性
4. 2つ目の抗体の比活性



ご存知ですか？

サンドイッチELISAでは、抗原の別々のエピトープに結合する2種類の抗体が必要となります。これには、別々の部位を認識する2種類のモノクローナル抗体か、アフィニティー精製した1種類のバッチのポリクローナル抗体のいずれかを用いることができます。

3.5.3 競合ELISAアッセイ

特定の標的に対して利用可能な2種類の抗体の「マッチドペア」がない場合、競合ELISAが選択肢となります。その名称が示唆する通り、このアッセイでは、試薬間の競合を利用して抗原の相対量を測定します。このアッセイでは、1つの試薬をホースラディッシュペルオキシダーゼなどの検出用の酵素と結合しなければなりません。酵素は、免疫原が一次抗体のいずれかに結合させます。競合ELISAにはいくつかの様式がありますが、以下に一例を示します。

競合ELISAは次のように実施することができます：

- 非標識の精製した一次抗体を用い、96ウェルマイクロタイタープレートのウェルをコーティングします。
- この一次抗体を、非標識の標準物質および未知のサンプルとインキュベーションし、平衡状態に達するまで反応させます。
- 標識した免疫原を加えます。この標識体は一次抗体に結合しますが、非標識の免疫原によって既に占有されている結合部位には結合できません。このため、サンプルまたは標準物質中の免疫原の量が多いほど、結合する標識免疫原の量は少なくなります。

平衡状態に達するまで競合させ、プレートを基質で「現像」します（以下に説明します）。化学発光または色の変化を測定し、サンプル中に存在する抗原の量を判定します。

競合ELISAの利点は、未精製の一次抗体を使用することができるという点です。前述の通り、複数の様式がありますが、競合する標識免疫原を用いる方法が一般的です。競合ELISAのその他の様式については、以下を参照してください：A Laboratory Manual, by Ed Harlow and David Lane (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring, New York, 1988).

3.5.4 ELISAの基質

沈降する基質を用いるウェスタンブロットとは異なり、ELISAでは水溶性の生成物を産生する基質を用います。よく用いられる酵素は、アルカリホスファターゼ (AP) や、ホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) です。酵素基質としては、安定した、安全で安価なものが理想的です。

これらの酵素は、無色の基質を有色の生成物に変換することができます。例として、p-ニトロフェニルリン酸 (pNPP) は、アルカリホスファターゼによって黄色いp-ニトロフェノールに変換されます。ペルオキシダーゼと共に用いられる基質には、2,2'-アゾ-ビス (3-エチルベンズチアゾリン-6-スルホン酸) (ABTS)、O-フェニレンジアミン (OPD) や、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン (TMB) などがあり、それぞれ緑色、オレンジ色、青色を呈します。



注意

アジ化ナトリウムは、ホースラディッシュペルオキシダーゼの阻害剤です。

HRP標識抗体を検出に用いる場合は、アジ化ナトリウムをバッファーや洗浄溶液に入れないようにしましょう。

発色性のELISA基質

アルカリホスファターゼ

基質	バッファー／二次基質	反応停止剤	製品の色	定量波長
p-ニトロフェニルリン酸 (pNPP)	MgCl ₂ を含有する Na ₂ CO ₃ , pH 9.8	NaOH, 2 M	黄色	405 nm

ホースラディッシュペルオキシダーゼ

基質	バッファー／二次基質	反応停止剤	製品の色	定量波長
3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン (TMB)	30%過酸化水素 (H ₂ O ₂)	1 M硫酸 (H ₂ SO ₄)	青色	450 nm
o-フェニレンジアミン (OPD)	クエン酸リン酸バッファー、0.02% H ₂ O ₂	硫酸 (H ₂ SO ₄)	オレンジがかった茶色	492 nm
2,2'-アジノジエチル-ベンゾチアゾリンスルホン酸 (ABTS)	クエン酸リン酸バッファー、30% H ₂ O ₂	20% SDS / 50% DMF	緑色	410 nm, 650 nm

最も感度の高いELISA検出法では、光を発する化学発光基質の反応を触媒する酵素を用います。例として、Luminata™ ELISA HRP基質は、HRPによって触媒されると、ルミノメーターを用いて検出可能なシグナルを産生します。

化学発光性のELISA基質

ホースラディッシュペルオキシダーゼ用

Luminata™ Crescendo ELISA HRP Substrate (カタログ番号: ELLUR0100)

Luminata™ Forte ELISA HRP Substrate (カタログ番号: ELLUF0100)

3.5.5 定量化

シグナルの定量化には、適切な波長で測定するよう設定したプレートリーダーカルシメーターを用います。サンプルの特異的なシグナルを、標準曲線と比較することで、サンプル中の抗原の相対量を推定することができます(以下の例を参照してください)。

標準曲線の作成には、既知濃度の抗原をX軸に、対応する吸光度をY軸にプロットします。標準曲線は、抗原濃度と対応する吸光度の直接的関連性を示すグラフになります。すなわち、サンドイッチELISAではサンプル中の抗原濃度が高いほど、吸光度も高くなります。未知のサンプル中の抗原濃度は、サンプルの吸光度をY軸にプロットし、そこから標準曲線と交差するまで平行線を引き、判定することができます。この点からX軸と交差するまで縦線を引くと、未知のサンプル中の抗原濃度となります。別の方法としては、データを、MILLIPLEX® Analyst 5.1ソフトウェアなどのコンピュータープログラムによる曲線適合ソフトウェアに入力することもできます。線形回帰分析によって良好な適合を得ることができますが、試験範囲の上端または末端のデータポイントを除いた方が、良好な適合が得られる場合もあります。

ELISAの結果を示す例を以下に図示します。既知濃度の抗原を用い、405 nmで吸光度を測定し、標準曲線を作成しました(青線)。サンプルの平均吸光度は1.42 nmでした。標準曲線に外挿すると、サンプルは約10 ng/mLの抗原を含有していることになります(赤点線)。

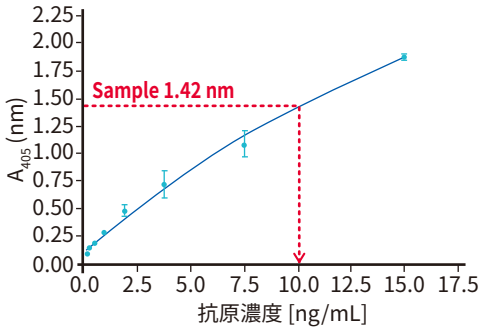


図 11. ELISA標準曲線とサンプル解析

3.5.6 トラブルシューティング:

問題	考えられる原因	解決策
シグナルが検出されない	使用した試薬が誤っている	特異的な試験ロットに対する試薬以外は使用されていないことを確認します。
	試薬が損傷している	有効期限を過ぎた試験キットを使用してはいけません。
シグナルが弱い	使用した試薬の希釈率が誤っている	使用する希釈率を慎重に調整します(通常用いられる希釈係数は100です)。
	フィルターが誤っている(波長)	マイクロタイタープレート光度計の波長を確認します。
	インキュベーション時間が短すぎる、温度が低すぎる	製品データシートで、ロットのインキュベーション時間に関する情報を確認します。(酵素基質のインキュベーション時間は、20~28℃の温度に適用されます)；吸光度が1.0未満の場合は、基質のインキュベーション時間を延長します
	試薬の温度管理が誤っている	2日目に用いる試薬が、試験キットと用いる前に室温(20~28℃)に達していることを確認します。
	アジ化ナトリウム、メルカプトエタノール、DTTは、高濃度ではペルオキシダーゼの活性に干渉する場合があります	アジ化ナトリウム、メルカプトエタノール、DTTを含有しないサンプル、または含有していても濃度が低い(0.1%未満)サンプル以外は使用しないようにしましょう。
シグナルが高い	使用した試薬の希釈率が誤っている	使用する希釈率を慎重に確認します(通常用いられる希釈係数は100です)。
	インキュベーション時間が長すぎる、温度が高すぎる	製品データシートで、ロットのインキュベーション時間に関する情報を確認します。(酵素基質のインキュベーション時間は、20~28℃の温度に適用されます)；吸光度が3.0超の場合は、基質のインキュベーション時間を短縮します。

問題	考えられる原因	解決策
バックグラウンドが高い (ブランク)	洗浄ステップが不十分である	プレート丁寧に洗浄し、各洗浄の後に液体を丁寧に除去します。
	洗浄溶液のコンタミネーション	水が汚染されていないことを確認します。洗浄溶液の溶解や希釈には、必ず再蒸留水を用います。
	過去の実験による試薬またはバイアル／チューブのコンタミネーション	試薬を今後の測定にも用いるのであれば、試薬のバイアルから直接ピペットで採取することは避けます。(酸化的な活性不純物は、非特異的な発色によって酵素基質に影響を及ぼす恐れがあります)。
	使用した試薬(抗体および酵素標識体)の希釈率が誤っている	使用する抗体および酵素標識体の希釈率を慎重に確認します(通常用いられる希釈係数は100です)。
実験の精度が低い (=ランダムエラー)	サンプルが不均一である(例、溶液が濁っている、サンプル中に粒子が認められる)	サンプルが、推奨されているサンプル調製手順に従い採取、調製、保存されていることを確認します(ポリプロピレンチューブ、透明なサンプルを-20℃で保存)。
	サンプルや標準物質の混合が不十分である	ピペットで採取する前に、サンプルや標準物質を慎重に混合します。
	ピペット操作のばらつき	ピペットを確認し、必要に応じて校正します。
	サンプルおよび／または標準物質間のキャリーオーバー	各ピペット操作の後に、ピペットチップを交換します。
	インキュベーション中の試薬の混合が不十分である	ピペット操作後に、試験プレートを慎重に揺らして試薬を混合します。試薬を至適に混合するためには、推奨されているステップでオービタルマイクロプレートシェーカーを用います。
	洗浄が不十分である	自動マイクロタイタープレート洗浄器が、適切に機能していることを確認します。各洗浄ステップの後は、残っている液体を完全に除去しなければなりません。
	液体が蒸発してしまう	インキュベーション中に、カバーシールがプレートと密着しているかどうか確認します。
	希釈係数の計算が誤っている	データの計算で用いられたサンプルの希釈率の希釈係数を確認します。
算出されたデータ値が高すぎる、または低すぎる (=システムエラー、 「典型的なデータ」からのデータの逸脱)	試験手順が変更されている	製品データシートに記載されている指示(インキュベーション時間、希釈率など)に、慎重に従います。
	サンプルの処理が誤っている	サンプルが、推奨されているサンプル調製手順に従い採取、調製、保存されていることを確認します(ポリプロピレンチューブ、透明なサンプルを-20℃で保存)。

3.6 マルチプレックスビーズベース解析

- 3.6.1 はじめに
- 3.6.2 テクノロジー
- 3.6.3 トラブルシューティング

3.6.1 はじめに

マルチプレックス解析は、その名称が示唆する通り、1回のアッセイで複数の分析対象を試験する技術です。マルチプレックス検出は、バイオマーカーのスクリーニングやタンパク質の解析に関するテクノロジーで、細胞、組織、生命体の機能に関わる複数の細胞間または細胞内タンパク質（総量またはリン酸化型標的）の発現を同時に調査することができます。

創薬やタンパク質研究において急速に拡大しつつある知識基盤によって、研究者は、タンパク質やシグナル経路を生物学的状態と関連付けるため、システムレベルのデータセットを迅速に入手・解析するよう迫られています。ELISAやウェスタンブロットなどの従来の「シングルプレックス」なタンパク質検出方法からは、このような情報を得ることは難しく、非実用的であり、高い費用が掛かります。マルチプレックス解析では、単一の複雑かつ不均一なサンプルから、多数の分析対象を検出・測定することができるため、特に、血清、脳脊髄液、腺性分泌物、その他の生理学的サンプルの分析に有用であることが実証されています。

3.6.2 テクノロジー

マルチプレックスタンパク質検出では、サンドイッチ免疫アッセイの様式で抗体を抗原に提示することが最も多く、「平面アレイ」としてチップ上に固定するか、「サスペンションアレイ」としてマイクロビーズに接合します。この万能で非常に感度の高い浮遊ビーズアレイは、Luminex社によって開発されたxMAP®テクノロジーに基づいています。

このシステムは、xMAP®マイクロビーズ、Luminex分析装置、解析ソフトウェアの3種類の中心的なテクノロジーを組み合わせたものです。

マイクロビーズは、最大で100種類の色を作製するため、2種類の赤色蛍光色素を用いて様々な濃度で染色されています。このため、アッセイの各マイクロビーズには色素濃度に基づく「スペクトルアドレス」があり、Luminex分析装置を用いて読み取り、特定することができます。これらのマイク

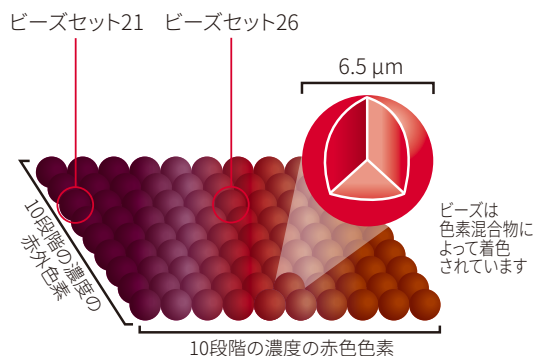


図12.

xMAP®テクノロジー:各サンプル/ウェルにつき最大100種類の分析対象を定量します。

ロビーズは、サンプル中の標的「分析対象」に特異的に結合する捕捉抗体でコーティングされています。レポーターに結合した2つ目の抗体を加えると、測定のための「サンドイッチ」ELISAが完成します（図13参照）。

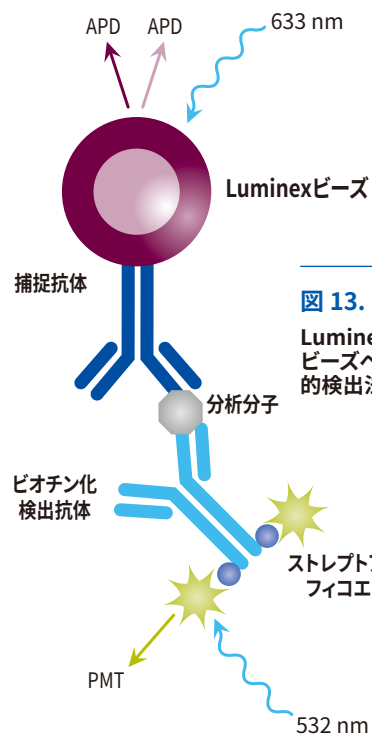


図13.

Luminex xMAP® ビーズベース免疫学的検出法の原理

マルチプレックスビーズベースアッセイの実施には、2種類のLuminex分析装置を利用可能です。Luminex 200™およびFLEXMAP 3D®システムは、フローサイトメトリーに基づく装置で、レーザー、光学機構、先端的な流体力学、高速デジタルシグナルプロセッサが統合されています(図14A)。MAGPIX®装置は、CCDに基づくシステムで、xMAP®の捕捉・検出力を、磁気ビーズによって可能となったスピードや効率と統合したものです(図14B)。

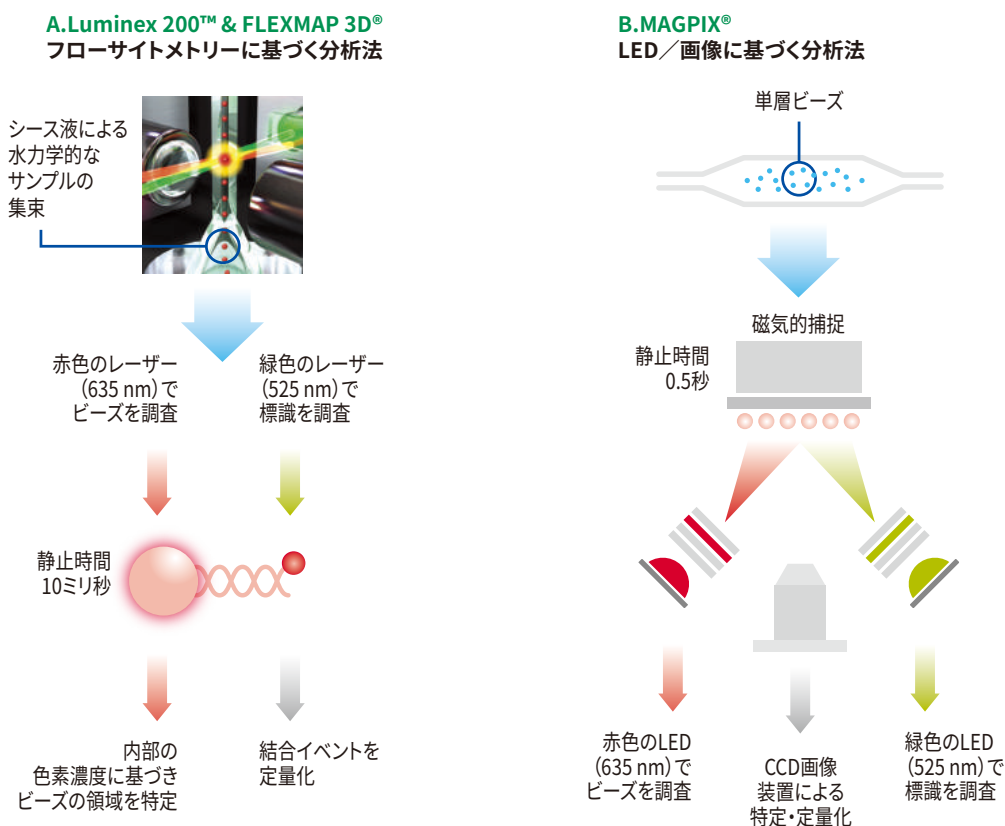


図 14.

xMAP®テクノロジーを用いたマルチプレックスビーズベース免疫アッセイによるデータの取り込みには、フローサイトメトリーに基づくもの(A)またはCCD画像に基づくもの(B)の2種類のLuminex装置が利用可能です。

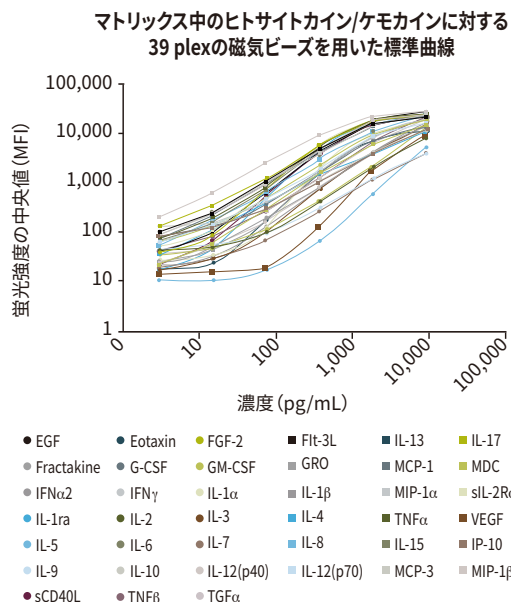
マルチプレックスビーズベースアッセイでは、存在する分析対象を特定するための「ビーズマップ」と、分析対象の濃度を判定するためのパネルの標準曲線が測定から得られます。個々のビーズに対して分類とレポーター測定が同時に行われるため、単一の少量サンプルから正確なマルチプレックスアッセイデータを入手することができる点が、従来のELISAとは大きく異なります。

マルチプレックスなバイオマーカーアッセイのデータ解析では、多様なサンプルやアナライタタイプの取り扱いが困難な場合があります。多様であるために分析対象の存在量や、それに関連したアッセイのシグナル強度が広範囲にわたる可能性がある上、それら全てを正確に予測または測定することは容易ではありません。MILLIPLEX Analyst 5.1ソフトウェアは、検量線の両端から得たデータに注目し、最適な定量なアナライタデータを生成する設計となっています。これらの領域のデータは重要ではありますが、既存のマルチプレックスデータ解析パッケージでは見逃されてしまうことが多くなっていました。

MILLIPLEX® Analyst 5.1ソフトウェア用の新しい曲線近似アルゴリズム開発では、曲線の両末端でCV値が最も低くなり、質の低い標準曲線でも良好に機能する曲線近似を判定するため、実測値に基づく標準曲線を用いた600以上のデータセットに対してシミュレーションを実施しました。

図 15.

MILLIPLEX® MAP マルチア
ナライトパネル (Luminex®
xMAPテクノロジーに基づい
ています)における分析的に検
証・確定された標準曲線によっ
て、再現可能な定量が可能とな
ります。



3.6.3 トラブルシューティング - マルチプレックスビーズベースアッセイ:

問題	考えられる原因	解決策
測定されたビーズの数が不十分である	プレートウォッシャーの吸引高さの設定値が適正ではない	製造業者の指示に従い、吸引高さを調節します。
	ビーズミックスの調製が不適切である	プロトコールに従い、ビーズミックスのボトルに加える直前に、ビーズのバイアルを超音波処理し、ボルテックスします。ピペットを用いてビーズミックスをプレートに入れる間、リザーブ容器内でビーズミックスを断続的に攪拌します。
	サンプル中の粒子状物質や粘度のために干渉が生じてしまう	上記参照。また、サンプルプローブをアルコールフラッシュ、バックフラッシュ、洗浄で清掃する必要がある場合があります。または、必要に応じてプローブを取り出して超音波処理します。
	サンプルプローブの高さが正しく調節されていない	製造業者の指示を参照します。Luminex 200™装置でアッセイの測定を行う場合には、Luminex社が推奨するプロトコールに従い、4つのアライメントディスクを用いてキットの固相プレートに合わせ、サンプルプローブの高さを調節します。FLEXMAP 3D™装置でアッセイの測定を行う場合には、Luminex社が推奨するプロトコールに従い、1つのアライメントディスクを用いてキットの固相プレートに合わせ、サンプルプローブの高さを調節します。MAGPIX® systemでアッセイの測定を行う場合には、Luminex社が推奨するプロトコールに従い、2つのアライメントディスクを用いてキットの固相プレートに合わせ、サンプルプローブの高さを調節します。
バックグラウンドが高すぎる	バックグラウンドのウェルが汚染されている	シーラーを適切に用い、プレートの試薬に触れないようにマルチチャネルピペットを用いてピペット操作することによって、ウェル間のコンタミネーションを避けます。
	洗浄が不十分である	洗浄回数を増やします。
ビーズが領域またはゲート内に入らない	Luminex装置が正しく、またはしばらく校正されていない	装置の製造業者の指示に基づき、少なくとも週1回、または温度が3°C超変化した場合に、Luminex装置を校正します。
	ゲート設定が正しく調節されていない	一部のLuminex装置では、キットのプロトコールに記載されているゲート設定とは異なる設定が必要となる場合があります。装置のデフォルト設定を使用します。
	プロトコールのテンプレートのビーズ領域が間違っている	キットのプロトコールで、正しいビーズ領域または分析対象の選択を確認します。
	使用したサンプルの種類が間違っている	有機溶剤を含有するサンプルや、粘度の高いサンプルは、必要に応じて希釈または透析します。
	装置が洗浄、または準備されていない	Luminex装置を4回気泡除去操作して準備を行い、アルコールや消毒液が残っている場合には、シース液か水で4回洗浄します。
	ビーズが露光してしまった	すべてのインキュベーションステップ中は、プレートやビーズミックスを暗色のフタかアルミホイルで覆っておきます。
プレート全体のシグナルがバックグラウンドと同じである	検出が不正確、または検出されない	適切な検出抗体を加えて継続します。
	抗体が添加されている	検出に競合する抗体がサンプル中に含まれていないことを確認してください。
	ストレプトアビジン - フィコエリスリンが添加されていない	プロトコールに従い、ストレプトアビジン - フィコエリスリンを加えます。

問題	考えられる原因	解決策
細胞溶解液の陽性コントロールのシグナルが低い	インキュベーションの際に温度、タイミング、または攪拌が不適切であった	アッセイ条件を確認する必要があります。
サンプルのシグナルが高すぎて飽和している	キャリブレーションターゲット値の設定が高すぎる	一部のLuminex装置では、RP1校正物質に対するデフォルトのターゲット設定が高PMTに設定されています。キャリブレーションに低いターゲット値を用い、プレートを再度分析します。
	細胞溶解液のコントロールやサンプルを用いたプレートのインキュベーションが長すぎた	インキュベーション時間を短縮します。
	サンプル中の分析対象の濃度が、アッセイのダイナミックレンジよりも高い	特定の分析対象のために、サンプルを希釈し、再度分析する必要があります。
サンプルのシグナルが低すぎる	サンプル中に分析対象が含有されていない、または検出レベル未満である	シグナルが検出レベル未満である場合には、サンプル容量を増やすこともできます。プロトコルの適切な修正に関しては、テクニカルサポートに確認してください。
サンプルおよび／または標準物質のばらつきが大きい	マルチチャンネルピペットが校正されていない	ピペットを校正します。
	プレートが均一に洗浄されていない	すべての洗浄ステップにおいて、すべての試薬が完全に除去されていることを確認します。
	サンプル中に粒子状物質やその他の干渉物質が多く含有されている	上記参照。
	プレートの攪拌が不十分である	すべてのインキュベーションステップ中は、垂直方向のプレートシェーカーを用い、ビーズが常に揺れ動きながらも飛び散らないスピードでプレートを攪拌します。
	ウェル間のコンタミネーション	プレートシーラーを再利用する場合には、試薬がシーラーに接触していないことを確認します。
		試薬の添加に使用したピペットチップを用いる場合には、ピペットチップがプレートの試薬に接触しないよう注意する必要があります。

知っておくと便利なテクノロジー

少量サンプルで複数の分析対象の同時検出を実現

MILLIPLEX® MAP

MILLIPLEX® MAPは、Luminex®およびxMAP®テクノロジーと25年間の経験に基づいています。

- 代謝性疾患、炎症・免疫疾患、神経変性疾患、毒性、癌などの広範な疾病にわたる幅広い分析対象が選択可能です。
- 微量サンプル (10～50 µL) から複数の分析対象を同時に検出するために必要なすべての構成部品や試薬が、1つのキットになっています (1つのカタログ番号)。
- 磁気ビーズフォーマットで利用可能です。磁気ポリスチレンビーズには、カプセルに包まれたマグネタイトが入っており、非磁気ビーズに匹敵する表面化学特性を有しています。四半期ごとに、新しい磁気ビーズパネルが弊社の製品群に加わります！
- プレミックスキットを選択するか、カスタムキットを設計するためにパネルから分析対象をお選び下さい。
- 品質管理によって、アッセイ性能が保証されています。
- 分析的に検証されたパネルによって、測定規模に関わりなく、再現性のある分析対象プロファイルが得られます。
- 複数の分析対象やロットにわたり標準化された標準曲線によって、ロット間の均一性が保証されています。
- 厳密な製造基準を満たすパネルによって、バッチ間の再現性が保証されています。
- 環境にやさしい包装を使用しています：環境への負荷を減らすため、弊社の箱は100%リサイクル可能となっています。
- 保存の必要性を減らすため、包装をまとめた製品も利用可能です。

詳細はこちらをご覧ください。<http://www.sigma-aldrich.com/milliplex-jp>



3.7 免疫組織化学／免疫細胞化学

主要なステップ

- 3.7.1 はじめに
- 3.7.2 標本調製
- 3.7.3 抗原賦活化
- 3.7.4 抗体染色
- 3.7.5 抗体検出
- 3.7.6 対比染色
- 3.7.7 トラブルシューティング

3.7.1 はじめに

免疫組織化学 (IHC) とは、特異的な抗体 - 抗原相互作用を利用し、組織切片の細胞から抗原 (例、タンパク質) を検出する工程を指します。IHCという名称は、手順で用いる抗体に関連する「immuno (免疫)」と、組織化学を意味する「histochemistry」が語源となっています。一方、免疫細胞化学 (ICC) は、細胞を意味する「cyto」という語に由来しており、組織ではなく、培養細胞が単離細胞を用いて行われます。IHCとICCは、それぞれ組織と細胞におけるバイオマーカーの分布や局在、差次的に発現しているタンパク質について理解するための基礎研究において広範に用いられています。

IHC／ICCの主なステップは次の通りです：

- ・ 標本調製
- ・ 抗原賦活化
- ・ 抗体染色
- ・ 抗体検出

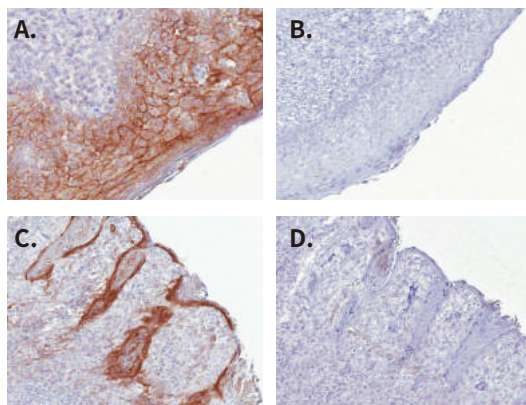


図 16.

ヒト扁桃腺組織を用いたIHCによるanti-desmoglein antibody (1:1,000, カタログ番号MABT118) の検証。ヒト扁桃腺組織を、抗原賦活化後にIHCで分析しました (HRP-DAB検出)。予測通り、重層扁平上皮 (A) ならびにヒト扁桃腺の扁桃陰窩を覆う上皮細胞 (C) において、細胞膜／細胞結合部の免疫反応性が認められました。同一の組織を陰性コントロール試薬 (一次抗体なし) で処理したところ、検出可能なHRP-DABシグナルは認められませんでした (B, D)。ヘマトキシリンによる組織の対比染色で、細胞核が青く染色されています。

3.7.2 標本調製

IHC染色を良好に可視化・解釈するためには、使用する組織切片の品質が重要となります。抗体インキュベーションや組織染色前に、いくつかの主要な準備を実施しなければなりません：

- ・ 固定
- ・ 包埋
- ・ 切片化

これらのステップとその次の抗原賦活化のステップは、有用な結果を得るために慎重に実施しなければなりません。技術にばらつきがあると、染色結果に多大な影響が及ぶ恐れがあります。これらのステップについて、以下に詳細に説明します：

固定

固定は、さらなる処理を可能とするために、生物組織を一定期間自然の状態に最も近い状態で保護・保存 (すなわち「固定」) するための化学的または物理的工程です。固定に使用する試薬、「固定液」は、タンパク質分解を止め、構造的安定性を強化し、微生物による腐敗を阻害するという3つの方法によって上記の目的を達成します。主な化学的固定液は、アルデヒド、アルコール、水銀、酸化剤、ピクリン酸です。物理的固定は、組織を冷凍することを意味することが多く、冷凍した場合は、その後の処理の前に、いずれかの時点で化学的固定を行います。

固定にあたっては、組織ブロック、組織切片、培養細胞、またはスミアを固定液に浸漬するか、動物の個体全体を研究する場合には、動物の循環器系を介して固定液を還流します。培養細胞の場合、細胞標本を浸漬するか、単に風乾します。

固定液は細胞や組織を安定化し、その後の処理や染色手順による酷烈な環境から保護します。固定液は、架橋の形成 (例、グルタルアルデヒドやホルマリンなどのアルデヒド)、凝固によるタンパク質変性 (例、アセトンおよびメタノール)、またはこれらを組み合わせたものなど、いくつかの方法で作用します。固定の強度や時間は、抗原や細胞構造を保持し、エピトープの遮蔽を最小にするために、最適化しなければなりません。固定の要件は、組織によって大きく異なる場合があります。免疫学的研究では、標本や標的抗原の適切性を保証するために、固定が特に不可避となっています。組織によってタンパク質含有量や立体配置が異なっているため、著しい固定を行わない場合にその構造を保持する能力も異なっています。標本の調製が不適切である

と、組織や細胞の抗原の標識が阻止または妨害される恐れがあります。残念ながら、組織構造の保存に最適な方法は、タンパク質を変化させることによって作用するため、一部のエピトープが遮蔽され、望ましい標的タンパク質の検出が妨げられてしまうこともあります。失敗した場合には、特異的染色を「あきらめる」前に、別の固定液や抗原賦活化方法を用いて実験を行うことが重要です。

包埋

免疫染色法で用いられるサンプルは、ほとんどの場合、優れた形態学的細部や解像度を得ることが可能なパラフィンで包埋されます。今日の「パラフィン」は、典型的にはパラフィンワックスと樹脂の混合物です。加熱すると液状になり、キシレンで溶解すると組織に浸潤し、比較的迅速に再び固体になり、切片化の間に最大の構造的サポートが得られるため、パラフィンは優れた包埋剤となっています。通常、小さな組織ブロック(10×10×3 mm)は最長24時間固定されます。パラフィン切片で最も一般的に使用される固定液は、ホルマリンをベースとするものです。組織におけるこれらの固定液の認容性は高く、浸透も良好です。(一般的な固定液の調製方法については、付録を参照してください)。

ブロックを透徹し、パラフィンで包埋した後、5～10 μm厚の切片をリボン状に切断し、スライドガラスに載せます。載せた後は、免疫染色が必要となるまで、スライドを長期間保存することができます。免疫染色を行う時は、組織からパラフィンを除去し、水をベースとするバッファーや抗体が浸透できるようにしなければなりません。

切片化

使用した包埋剤(パラフィンまたは水性の凍結剤)に基づいて、その後の切片化はマイクロームまたはクライオスタットいずれかで実施されます。マイクロームは通常、パラフィン包埋した組織ブロックに対して室温で使用し、1～60 μmの超薄切片が得られます。クライオスタットは、基本的にはマイクロームが温度を調節したキャビネットに入ったもので、切片化に用いるすべての器具や組織ブロックを-10～-30℃に保ちます。至適な切片の厚さは約5 μm(可能であれば)で、これくらいだと細胞の重なりが最小になることが多いようです。



ご存知ですか？

組織の処理が少ないほど(すなわち、固定が短時間で、包埋が緩く、処理時間が短いほど)、抗原賦活化の必要性も少なくなります。

3.7.3 抗原賦活化

固定した組織における抗体と抗原の免疫学的反応を促進するために、標本の前処理によって抗原を露出または「賦活化」させる必要が生じる場合があります。抗原の賦活化(抗原復活と呼ばれることもあります)には多数の様式があり、抗原や抗体によって必要となる抗原賦活化方法が異なります。抗原賦活化によって、組織中の大多数の抗原の反応性が増加することが示されています。免疫細胞化学における抗原賦活化の使用はあまり一般的ではありませんが、特定の抗体と抗原の組み合わせによっては、細胞標本に対しても実施可能です。ただし、組織の場合と比較し、細胞における抗原賦活化では、処理の時間や強度は相当に劣ります。抗原賦活化には、特異抗体との相互作用に対する抗原の利用能を最大化するための様々な方法があります。最も一般的な方法は次の通りです：

- 酵素消化
- 加熱によるエピトープ賦活化(HIER)
- クエン酸処理

酵素消化

この方法では、ワックス除去、再水和、流水による標本の水洗を行います。その後、標本を適切なバッファーで平衡化し、37℃または室温でタンパク質分解性酵素とインキュベーションします。使用される酵素には、プロナーゼ(PBS中で0.05% w/v)、トリプシン(0.1% CaCl₂を含有するPBS中で0.05% w/v)、ペプシン(2N HCl中で0.05% w/v)があります。濃度、時間、温度などの条件を調節し、酵素によって固定化の間に形成された接合の一部が切断され、抗原部位が露出するものの、抗原が完全には消化されないようにしなければなりません。抗体を用いた処理の前に、標本を低温のバッファー(4℃)に入れ、酵素活性を停止させます。一部の抗原／組織に対しては、このような方法を考慮しましょう。(Shi, S. -R., *et al.* (1993) *J. Histochem. Cytochem.* 41:1599-1604を参照してください) しかし、タンパク質分解性酵素は、一部の抗原の反応性を消失させてしまう恐れもあります(Pileri, S., *et al.* (1997) *J. Pathology* 183: 116-123を参照してください)。

加熱によるエпитーブ賦活化(HIER)

HIERは、以下の方法によって行うことができます：

- ・ マイクロ波照射
- ・ オートクレーブまたは圧力処理

ホルマリン固定し、パラフィン包埋した標本をバッファーに入れ、マイクロ波を照射すると、抗原の賦活化が顕著に高まることが認められています。この手順では、供給されたエネルギーが固定化の間に形成された結合の一部を切断する助けとなり、利用可能な抗原を含有する細胞の数が増え、反応の強度が増加します。しかし、正確な機序はわかっていません。マイクロ波を照射する工程では、ダメージや乾燥を防止するために、組織切片をモニタリングすることが重要です。バッファーの量、照射回数、使用するマイクロ波の単位などの条件を実験間で一定に維持することによって、染色結果のばらつきが少なくなります。1回のマイクロ波照射で処理可能なサンプル数は限られています。通常、何らかのバッファー（下記参照）に入れた標本を、全出力または部分出力で2、3分間加熱します。定期的に加熱を停止し、液体を補充します。設定時間が経過した後、スライドを入れた溶液が徐々に室温まで冷めるのを待ち、その後スライドをPBSですすいで染色に用います。

オートクレーブまたは圧力処理は、HIERを行うための別の方法です。手順を標準化するため、標準量の事前に加熱した溶液を用いて開始することが重要です。標本を沸騰した賦活液に入れた後、オートクレーブまたは圧力処理装置の圧力を可能な限り迅速に最大まで上げ、その時点から加熱時間を正確に測ります。加熱時間（通常1～2分）の終了後に、圧力を下げます。可及的速やかに、冷水を用いて加熱したバッファーを流し出します。（切片を乾燥させてはいけません）。その後、標本をバッファーで洗浄します。マイクロ波とオートクレーブのいずれにおいても、最も重要な

点は組織の加熱であると思われます。使用する溶液のpHや組成も、抗原部位の露出に重要です。研究によって、マイクロ波とオートクレーブで著しい差異はないことが明らかになっていますが、使用する溶液によっては著しい差異が生じます。一般的に用いられるバッファー溶液は、0.01 Mクエン酸バッファー（pH 6.0）、0.1 M Tris- HCl（pH 8.0）、1 mM EDTA（pH 8.0）ですが、最も多く用いられているのはクエン酸バッファーです。オートクレーブや圧力処理装置では、電子レンジよりも多くの標本を1回で処理することができます。ただし、細胞学的細部の保存に関しては、加圧処理した切片の方が若干劣る場合があります。以下から推奨されるHIERのプロトコルを入手することができます：http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/SAJ/Brochure/1/j_recipeabihc.pdf

クエン酸インキュベーションは、多くの組織に使用可能なより穏やかな方法です。これは、ブロッキング後、一次抗体を加える前に、37°C、pH 3.0のクエン酸バッファー中で30分間インキュベーションするという単純な方法です。染色前に、スライドをpH 7.4のPBSかTBSですすぎます。バッファーの組成として、2.1 gのクエン酸を 400 mLのddH₂Oに加え、pHが3.0超である場合は酢酸で、3.0未満である場合は1N NaOHでpH 3.0に調整します。ddH₂Oを加えて最終容量を1 Lにします。

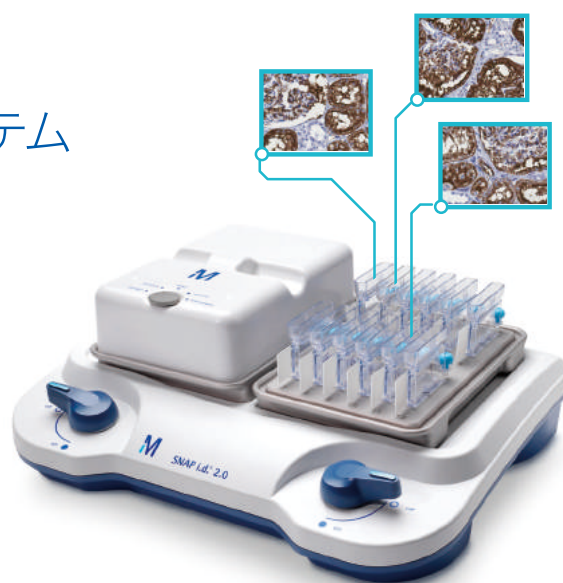
知っておくと便利なテクノロジー**スライドの扱いを最小限に
免疫染色用吸引式免疫反応システム****SNAP i.d.® 2.0 システム for IHC**

従来のIHC法では、ばらつきを修正するためにPAPペンやピペットの使用だけでなく手動でスライドの取り扱いを行う場合があります。

SNAP i.d. 2.0タンパク質検出システムはスライド取り扱い時間を短縮し、最大24枚のスライドを一度に処理することで、自動化のコストをかけずにスライド間のばらつきを低減することに挑みます。

加えて、本システムは洗浄工程を迅速にし、抗体を回収して再利用することを可能にするので、研究者は貴重な時間とリソースを節約できます。

詳細はこちらをご覧ください。：www.merckmillipore.jp/snapihc



3.7.4 抗体染色

抗体の特異性を利用し、組織切片や培養細胞中のタンパク質やその他の対象の標的を視覚的に局在化させるには、いくつかの方法があります。

直接標識法では、酵素または蛍光プローブで直接標識した一次抗体を用います。

間接標識法は、一次抗体と二次抗体を必要とする2ステップの工程です。二次抗体は、一次抗体の軽鎖または重鎖（またはその両方）に特異的で、酵素か蛍光プローブで標識されています。

直接または間接標識法によって生じるシグナルは、ビオチン標識した一次または二次抗体を用いて増強または増幅することができます。ビオチン化抗体は、酵素または蛍光プローブに結合した複数のストレプトアビジンタンパク質に結合します。

免疫組織染色の工程

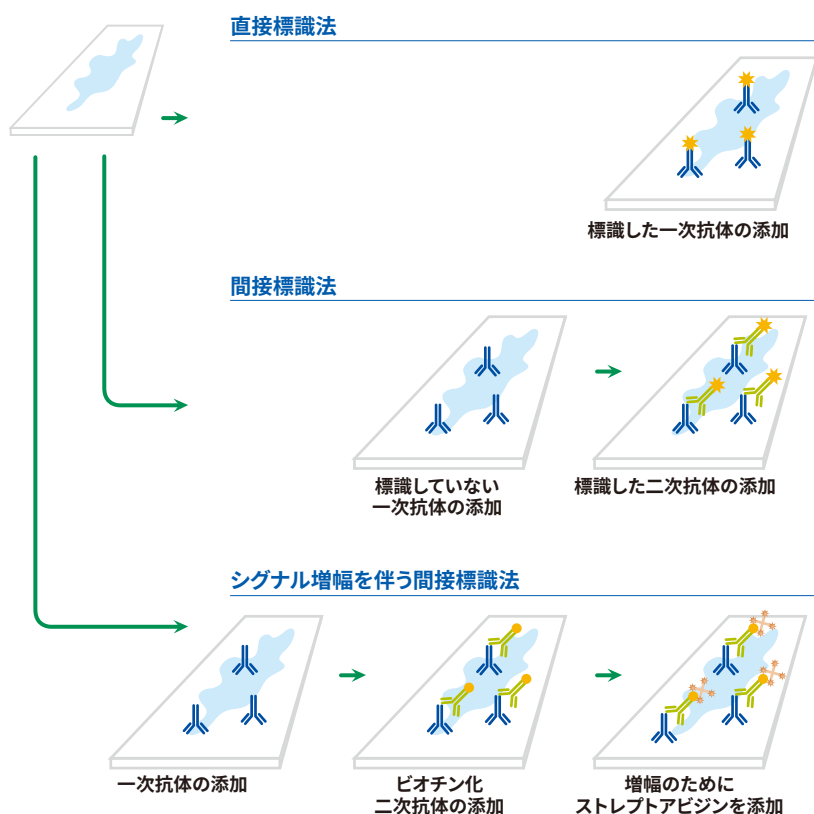
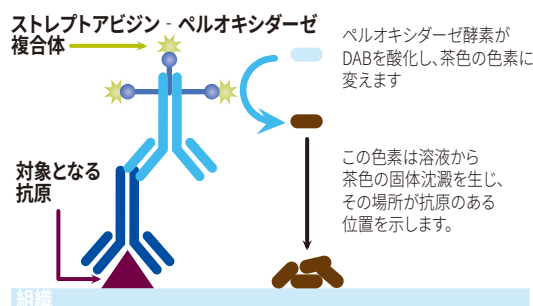


図 17. IHCの工程には、直接標識法（上）、間接標識法（中）、シグナル増幅を伴う間接標識法（下）があります。

酵素標識した免疫複合体の視覚化には、酵素によって色素原を触媒し、有色の色素を生じさせる追加的なステップが必要となります。ホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) やアルカリホスファターゼ (AP) は典型的な酵素標識ですが、これらに匹敵する色素原も継続的に増えています。

一次抗体は、酵素（HRPやAPなど）または蛍光プローブ（FITCやローダミン）で直接標識される場合も、標識されない場合もあります。標識しない場合には、標識した二次抗体か、より複雑な検出系が必要です。二次抗体を用いる場合には、一次抗体を産生した動物の免疫グロブリンに対するものを用いなければなりません。例として、一次抗体がウサギで産生されたものであれば、二次抗体はヤギ抗ウサギ抗体などになります。一次抗体と二次抗体のいずれに対しても、バッチごとに至適な力価を判定する必要があります。

図 18.
比色分析によるIHCシグナル
の組織内局在化の原理



各抗体に対し、使用する実験系において適切に機能する希釈率を最適化しなければなりません。同一の実験系が、すべての抗体に対して機能するわけではありません。製品データシートを、希釈系列の開始点のガイドとして用いることができます。（利用可能な希釈プロトコールについては、付録をご参照ください）。至適な抗体希釈率は、特異的な抗原の染色が最も強力でありながら、非特異的なバック

グラウンドが最も低い希釈率です。その他の制御された実験と同様に、1回に変更する実験変数は1つのみにするようにしましょう。一次抗体の至適な力価／希釈率を判定した後、二次抗体の希釈率を最適化します。

組織切片の染色では、通常25～50 μ Lの希釈した抗体とインキュベーションします（注：組織を完全に覆ってインキュベーション中に乾燥しないようにするため、十分な容量を使用しなければなりません）。インキュベーション時間は、37°Cで30～90分、室温で1～6時間、4°Cではオーバーナイトです。インキュベーション時間は、それぞれの抗体／抗原の組み合わせについて経験的に最適化される必要があります。

ご存知ですか？

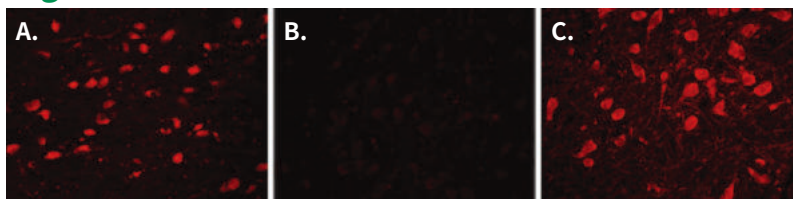
動物組織を適切に採取するためには、機関によって承認された安楽死または麻酔、還流、適切な全身解剖が必要となる場合があります。ヒトの組織を採取する際には、死因、薬物療法、病的状態、死後経過時間（PMI）、処理時間／条件を考慮しなければなりません。

知っておくと便利なテクノロジー

顕微鏡手順にすぐに使用可能な自家蛍光除去方法

Autofluorescence Eliminator Reagent

加齢に伴い、自家蛍光色素であるリポフスチンが、ニューロンを含む多くの細胞の細胞質に蓄積します。リポフスチン顆粒は、励起および発光スペクトルが幅広く、最も一般的に用いられている蛍光プローブのスペクトルと重複しているため、中枢神経系の蛍光顕微鏡検査が複雑化する恐れがあります。Autofluorescence Eliminator Reagent（カタログ番号 2160）は、ヒト、サル、ラットの神経組織やその他の組織の切片において、その他の蛍光標識に有害な影響を及ぼすことなく、リポフスチンのような自家蛍光を低下させるか、除去します。



成人男性の脳のマイネルト基底核を通る40ミクロンの切片。切片は、未処理（A）、Autofluorescence Eliminator Reagent（カタログ番号2160）で処理（B）、またはpolyclonal goat anti-ChAT antibody（カタログ番号AB144P）で染色し、Cy3標識二次抗体で視覚化後、Autofluorescence Eliminator Reagentで処理したもの（C）。画像は、20×対物レンズを用いたBio-Rad Radiance 2100 MP Rainbow共焦点顕微鏡を用いて取得されました。イルミネーションには543 nmのレーザー光線を用い、555～625 nmで発光を計測しました。画像の取得条件（レーザー出力、PMTゲイン、ピンホールの直径、バックグラウンドレベル）は、これらの3枚の画像ですべて同一です。写真は、University of Wisconsin-Madison, W.M. Keck Laboratory for Biological ImagingのMichael HendricksonおよびRonald Kalilの好意によって提供されたものです。

詳細はこちらをご覧ください。

www.merckmillipore.jp/product/MM_NF-2160

知っておくと便利なテクノロジー

内在性タンパク質の存在や相互作用の高感度検出に

Duolink® PLA (Proximity Ligation Assay)

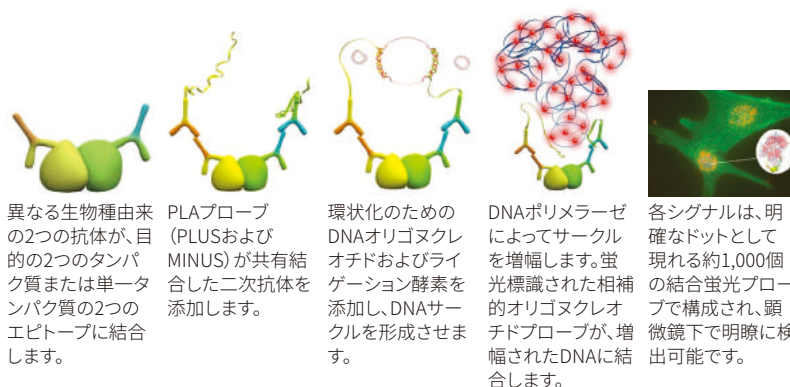
Duolink PLA (Proximity Ligation Assay: 近接ライゲーションアッセイ) は固定された細胞または組織のタンパク質を検出するため免疫蛍光染色 (IF) 用または免疫組織化学染色 (IHC) 用の一次抗体と共に用い、一对のオリゴヌクレオチド標識抗体 (PLAプローブ) が近接 (40 nm以内) する場合のみシグナルを1,000 倍に増幅するため、高感度なタンパク質解析を実現します。

強制発現や遺伝子操作を行わず、内在性タンパク質を可視化、定量するため、標的タンパク質をネイティブな状態で解析することが可能です。

- 低濃度内在性タンパク質の検出に
- タンパク質間相互作用の検出に
- 翻訳後修飾の検出に

Duolink PLAの原理やプロトコール動画などがこちらのページにてご覧いただけます

www.sigma-aldrich.com/duolink-jp



異なる生物種由来の2つの抗体が、目的の2つのタンパク質または単一タンパク質の2つのエピトープに結合します。

PLAプローブ (PLUSおよびMINUS) が共有結合した二次抗体を添加します。

環状化のためのDNAオリゴヌクレオチドおよびライゲーション酵素を添加し、DNAサークルを形成させます。

DNAポリメラーゼによってサークルを増幅します。蛍光標識された相補的オリゴヌクレオチドプローブが、増幅されたDNAに結合します。

各シグナルは、明確なドットとして現れる約1,000個の結合蛍光プローブで構成され、顕微鏡下で明瞭に検出可能です。

	Duolink PLA	IP/Western	FRET/BRET
検出可能な相互作用	安定、一過性もしくは弱い相互作用	高親和性の相互作用	安定な相互作用
細胞内タンパク質の局在検出	○	○	○
標的タンパク質の定量	○ ソフトウェア使用	× 半定量的	○ ソフトウェア使用
内在性タンパク質の検出	○ 高感度	△	× 遺伝子操作が必要
検出感度	◎ 非常に高く、1分子検出が可能	× 低く、低精度	△ 中程度
対象サンプル	固定済み細胞組織 (凍結切片、パラフィン包埋切片、ホルマリン固定切片)	細胞または組織抽出液	生細胞

3.7.5 抗体検出

最も一般的に用いられている2種類の検出方法は以下の通りです：

- ・ 発色または酵素による検出方法
- ・ 蛍光に基づく検出方法

電子顕微鏡の出現に伴い、大型の金粒子を含有する抗体を用いた抗原の検出も頻繁に行われています。光学顕微鏡レベルでも視覚化することができますが、現在、金粒子

で標識された抗体電子顕微鏡法以外で使用されることはほとんどありません。光学顕微鏡で一般的な抗体の検出方法は、次の通りです。

発色または酵素による検出方法

酵素によって変換される基質を選択する際には、沈降する生成物を生じる基質を選択しましょう。一般的に使用されている基質の一覧を以下に示します。

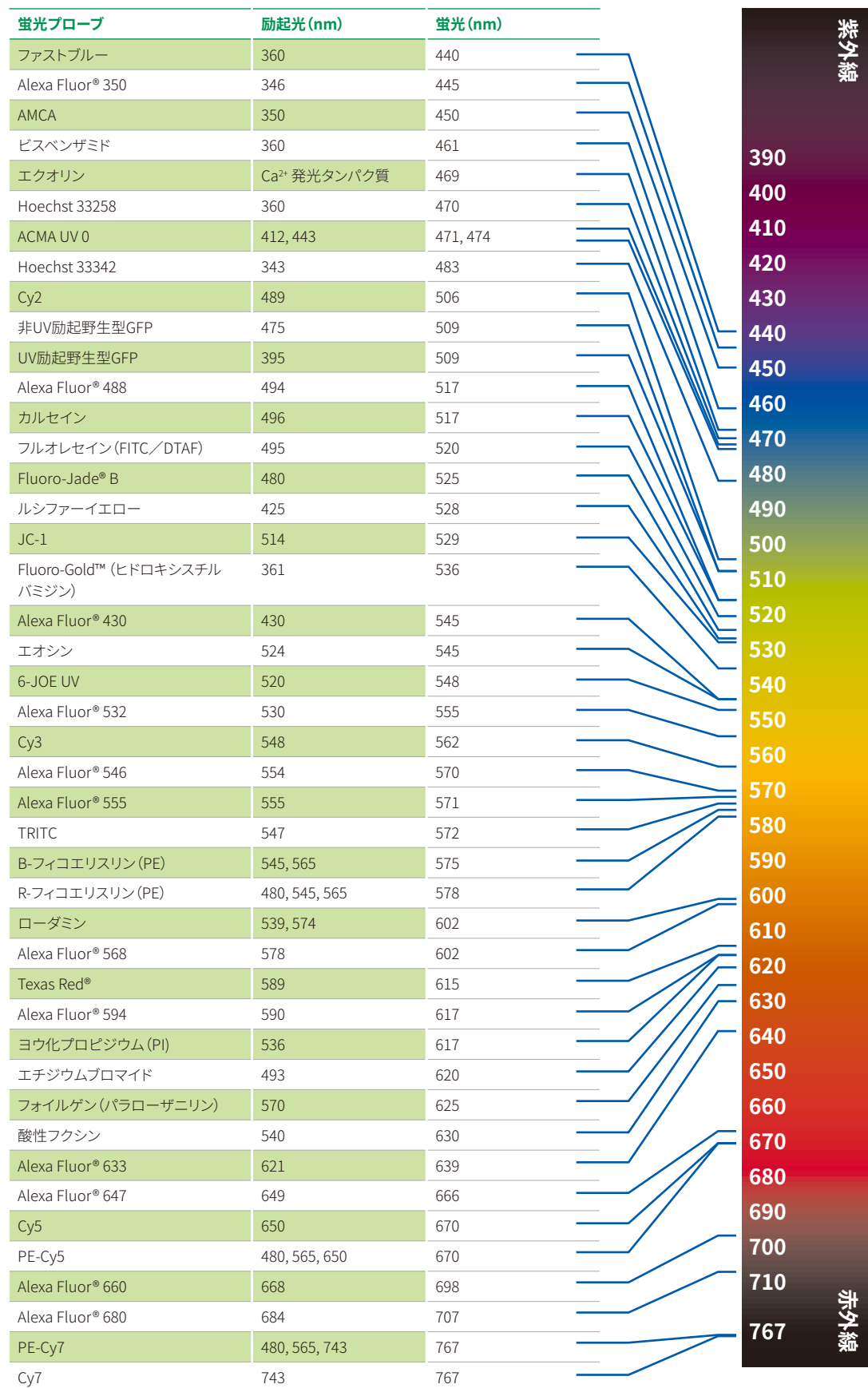
基質	略語	最終的な色	アルコールにおける可溶性(対比染色用)
ジアミノベンジン	DAB	茶色	なし
3,3'-ジアミノベンジン (DAB) は、アルコールやその他の有機溶剤において高度に不溶性である茶色の最終生成物を産生します。DABの酸化によって重合が起こります。DABは四酸化オスミウムと反応可能であるため、電子顕微鏡観察ならびに従来の免疫組織化学の分野において非常に有用です。			
ニッケル強化ジアミノベンジン	DAB／ニッケル	灰色／黒色	なし
DAB／ニッケルでは、アルコールに耐性があり対比に優れた強度の高い染色を得ることができ、強化を伴わないDABよりも最大で40倍感度が高くなっています。			
3-アミノ-9-エチルカルバゾール	AEC	赤色／茶色	あり
3-アミノ-9-エチルカルバゾール (AEC) は、赤色／茶色の反応生成物を産生し、免疫組織化学染色に広範に用いられています。AECで処理したスライド標本は、アルコールやアルコール溶液(例えば、Harrisのヘマトキシリン)には浸漬してはいけません。代わりに、水性の対比染色剤や封入剤を用います。またAECは、露光するとさらに酸化されやすくなるため、時間が経つと色が薄くなります。暗室で保存し、光の下での観察は短時間にすることが推奨されています。			
4-クロロ-1-ナフトール	4-CN	青色／灰色	あり
4-クロロ-1-ナフトール (4-CN) は、青色の最終生成物として沈降します。4-CNはアルコールやその他の有機溶剤に可溶であるため、スライドを脱水したり、アルコール性の対比染色剤に曝露したり、有機溶剤を含有する封入剤を用いてカバーガラスを載せたりしてはなりません。DABとは異なり、4-CNは沈降箇所から拡散する傾向にあるため、免疫組織化学に勤められることはあまりありませんが、ウェスタンブロットには使用することができます。			
ナフトールAS B1ホスフェート／ファストレッドTR	NABP/FR	赤色	あり
ナフトールASは、アルカリホスファターゼの基質として作用し、ファストレッド色素原が酵素部位に沈降し、鮮やかな赤色／ピンク色を生じます。沈降物はアルコールに可溶であるため、水性の対比染色剤や封入剤を用います。			
ナフトールAS MX ホスフェート／ファストレッドTR	NAMP/FR	赤色	あり
ナフトールASは、アルカリホスファターゼの基質として作用し、ファストレッド色素原が酵素部位に沈降し、鮮やかな赤色／ピンク色を生じます。沈降物はアルコールに可溶であるため、水性の対比染色剤や封入剤を用います。			
ナフトールAS B1ホスフェート／ニューフクシン	NABP/NF	赤色／青紫色	あり
ナフトールASは、アルカリホスファターゼの基質として作用し、ニューフクシン色素原が酵素部位に沈降し、鮮やかな赤色／青紫色を生じます。沈降物はアルコールに可溶であるため、水性の対比染色剤や封入剤を用います。			
ブロモクロロインドイルホスフェート／ニトロブルーテトラゾリウム	BCIP/NBT	紫色	なし
5-ブロモ、4-クロロ、3-インドイルホスフェート (BCIP)／ニトロブルーテトラゾリウム (NBT) 基質は、一般的に用いられている色素原です。BCIPはアルカリホスファターゼの基質として作用し、NBTが沈降物の紫がかった茶色を増強します。BCIP／NBTは有機溶剤との適合性があるため、ヌクレオファストレッドやメチレングリーンなどのアルコールをベースとした対比染色剤と用いることができます。			

ペルオキシダーゼ

アルカリホスファターゼ

蛍光に基づく検出方法

UV光を用いた検出を目的とし、蛍光を発する分子で抗体を標識することができます。例としては、フルオレセイン、ローダミン、Texas Red®、Cy3、Cy5などがあります。蛍光色素の選択肢は、利用可能な顕微鏡のフィルターセットによって限定されます。ほとんどのフィルターセットには、ローダミンやフルオレセインが最も適しています。Texas Red®も、ローダミンフィルターセットで使用可能な場合があります。



多数の封入剤には、DABCOなどの「褪色防止」溶液が含まれており、サンプルの観察時間を延長できます。弊社では、基本的な蛍光封入液（カタログ番号5013）や、4', 6'-ジアミノ-2-フェニルインドール二塩酸塩 (DAPI) などの核酸染色剤を含有する対比染色増強液（カタログ番号S7113）など、多様な蛍光封入液や対比染色液を提供しています。

3.7.6 免疫組織化学における対比染色

過去数十年の間、組織化学染色は、基礎研究分野ではほとんど免疫染色法に置き換わっています。(診療においては組織化学染色法がまだ優勢です)しかし、組織の顕微鏡検査においては、利用可能な色の数が限られているという点が主な欠点となっています。この欠点を克服するために、組織化学的対比染色法が用いられるようになりました。組織切片を二重に、場合によっては三重にも染色することによって、いくつかの利点が得られ、組織形態や存在する抗原の細胞内位置の検討や同定が可能となります。最初の染色を対比させて目立たせるために、2つ目の染色剤を用います。このためには、色素原(例、ヘマトキシリンやヌクレオファストレッド)と蛍光色素(例、DAPIやファロイジン)の両方が、実験デザインに合わせて一般的に用いられています。

ヘマトキシリンは、核酸染色のために最も一般的に用いられている色素の1つです。酸化ヘマトキシリンをアルミニウムイオンと組み合わせると、活性型の金属-色素複合体が形成され、ヒストンのリジン残基に結合するため、哺乳類細胞の核が青色に染まります。一方、ヌクレオファストレッドは核酸を染色し、ヘマトキシリンよりもかなり迅速に作用します。DAPIやHoechstなどの蛍光染色は、DNAの間に侵入し、紫外線で励起すると強い青色を発します。

3.7.7 トラブルシューティング:

問題	考えられる原因	対策
染色が認められない	抗原が認められない	該当する組織において対象のタンパク質が存在しているかどうか、文献を確認します。または、 <i>in situ</i> ハイブリダイゼーションによってmRNAの発現を確認します。
	抗体の保存が不適切	抗体は分注し、小容量で保存します。製造業者の指示に従い保存しましょう。凍結・融解の繰り返しを避けます。
	組織の固定が不十分	別の固定法を試すか、固定時間を変更します。
	組織の固定が過剰	固定時間を短縮するか、組織を室温ではなく+4℃で固定します。
	一次抗体と二次抗体の適合性がない	一次抗体と相互作用する二次抗体を使用します(二次抗体の使用については、第2.5章を参照してください)。
	二次抗体溶液に不良がある	新鮮な抗体試薬を調製します。
	酵素・基質反応性;基質バッファのpHが不適切	脱イオン水は、酵素活性を低下させるペルオキシダーゼ阻害剤を含有している場合があります。特定の基質に対して推奨されているpH範囲のバッファを使用します。
組織の染色が過剰	一次および/または二次抗体の濃度が高すぎる	至適な濃度を判定し、さらに低い濃度を試してみます。
	インキュベーション時間が長すぎる	インキュベーション時間を短縮してみましょう。抗体、基質、酵素など、それぞれを用いて時間を最適化します。
	一次および/または二次試薬による組織への非特異的結合	非特異的結合を最小化または阻害するために組織を処理します。
バックグラウンドが高い	インキュベーション混合液に含まれている内因性分子が、組織中にも高レベルで存在している可能性がある。例として、血球細胞中のペルオキシダーゼが、組織に残留している場合がある	一次抗体の供給源とは異なる種に由来する正常血清とインキュベーションしてみましょう。 干渉するペルオキシダーゼが含まれている組織に対しては、0.3%過酸化水素を含有するメタノール中で、室温で30分間処理します。
	二次抗体による交差反応性または非特異的結合	二次抗体が、標的以外の抗原が有する同一のまたは類似エпитープに強度または中程度の親和性を示す場合があります。例として、スライドのコーティングに用いられることがある卵白は、アビジンを大量に含有しています。染色中にアビジンがビオチン化二次抗体に結合することを防止するため、卵白の使用は避けましょう。

3.8 フローサイトメトリー

主要なステップ

- 3.8.1 はじめに
- 3.8.2 フローサイトメトリーにおける抗体
- 3.8.3 検出方法
- 3.8.4 サンプル調製
- 3.8.5 ブロッキング
- 3.8.6 抗体インキュベーション
- 3.8.7 データ取り込み
- 3.8.8 トラブルシューティング

3.8.1 はじめに

フローサイトメトリーは、不均一な浮遊細胞集団を、物理的特性や蛍光強度に基づいて特性解析および／または選別するための強力な統計解析技術です。フローサイトメリーの原型は50年以上も前に開発されたものの、この技術は1960年代後半まで商品化されませんでした。

フローサイトメトリーとは、細胞懸濁液中の粒子（細胞など）がレーザーやその他の光源を通過する際に、その細胞特性や蛍光特性を測定する手法として定義されています。

フローサイトメトリーによって、サンプルの特定の細胞集団やその中のサブセットが明らかになり、蛍光活性化細胞選別（FACS）によってそれらの特定の細胞集団を物理的に分離することもできます。細胞選別では、蛍光特性に基づき細胞の電荷を操作し、粒子を静電偏向させます。付着細胞や固形組織も、細胞の分散処理によって単細胞懸濁液を調製することができれば、解析することができます。

フローサイトメトリーは、細胞サンプルを水力学的に集中させて単細胞の流れを作り、レーザーの前を通過させることによって機能します。細胞が入射光を散乱させる様式から、細胞の大きさや細胞内部の複雑性を判定します。1秒に数千個の粒子が処理されます。アナログデータがデジタルデータに変換された後、デジタルデータが定量化され、2次元（または3次元）でプロットされます。

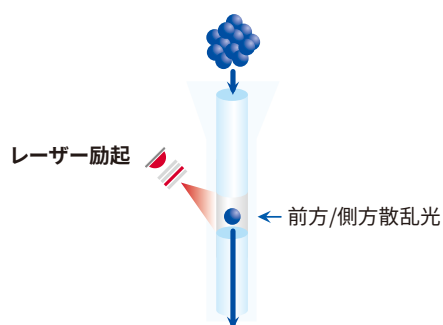


図 19.

Guava easyCyte™ 8HTなどのフローサイトメーターは、レーザーで単細胞を励起させ、その後の蛍光や屈折光を検出することによって、細胞分析に関する複数のパラメータを提供します。

最先端のサイトメトリー

過去10年間に、マイクロキャピラリー方式のフローサイトメトリーが広く用いられるようになりました。マイクロキャピラリー方式のフローサイトメトリーは、従来のシース液をベースとするフローサイトメーターと比較し、使用するサンプル容量や試薬、廃液が少なく、ランニングコストも安価になっています。また、フローサイトメトリーの小型化も進められており、非常にコンパクトなベンチトップ型の細胞分析装置が製造されています。このような進歩や小型化によって、フローサイトメトリーは、細胞を用いた多くの解析において、ほぼ日常的に実施されるステップとなりました。

イメージングフローサイトメトリーは、フローサイトメトリーの検出力や高速処理能を、免疫細胞化学や顕微鏡の視覚化能と組み合わせたものです。この組み合わせによって、これまでのどのような技術よりも包括的なタンパク質の局在や分布に関する一連のデータを、単細胞サンプルから得ることができます。

これらの細胞分析プラットフォームに関する情報は、以下から入手可能です：<http://www.sigma-aldrich.com/flow-cytometry-jp>

病院におけるフローサイトメトリー：

現代の設備の整った臨床ラボラトリーにおいて、フローサイトメーターがないということはまずないでしょう。フローサイトメーターは、基本的な医学的スクリーニング・診断ツールとなっています。臨床ラボラトリーの研究者は、医師から全血球計算（CBC）を依頼されると、末梢血サンプルのフローサイトメトリー解析を実施します。CBCは、従来は血液スミアの顕微鏡検査を必要とする検査でした。このため、病理学者が検査可能な視野の数によって、解析の検出力が限られていました。CBCを得るためには、白血球の差次的な光散乱特性を利用し、それぞれの末梢血細胞の相対的な存在量を、迅速かつ統計学的に高い信頼性で判定します。前方および側方散乱光によって、貧血や骨髓異形成症候群などの病状によるサイズや形状の異常などを検出することもできます。既知の疾患マーカーに対する抗体検査が加わったことによって、フローサイトメトリーは、臨床診断や治療の進展の評価においてさらに有用となっています。

3.8.2 抗体とフローサイトメトリー

光散乱特性によって細胞集団の特性を大まかに明らかにすることはできますが、分集団をより正確に同定するためには、細胞のサブタイプに固有の表面または細胞内成分に結合するプローブが必要となります。例として、末梢血サンプルではすべてのリンパ球のサイズや細胞内の複雑性が同一な場合があります。そのような例でも、細胞表面受容体（例として、CD4、CD8、CD19など）に特異的な蛍光標識抗体で細胞懸濁液を処理すれば、それぞれヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞、B細胞を検出できます。

基本的なシングルレーザーのフローサイトメーターでも、4種類以上の蛍光プローブを同時に検出するために十分なフィルターが備わっていることが多く、現在では1回の実験で最大18種類の波長を識別することが可能となっています。これらの複雑な蛍光プローブのパレットからシグナルを入手するためには、複数のレーザー、適切なフィルター、主に一次標識体からなる抗体の選択が必要となります。これは、標識済み二次抗体を使用すると種間の交差反応性や、目的外の標的への二次抗体の結合によって、データが解釈不可能になりやすいためです。

3.8.3 検出方法

その他の免疫学的検出法と同様に、フローサイトメトリーによる特定の細胞成分の探索を目的とした抗体の使用には主に3つの方法があります：

- 直接検出法
- 間接検出法
- ビオチン化検出法

直接検出法

直接検出法とは、対象のエピトープに特異的に結合する一次抗体を用いるシングルステップの染色工程を指し、一次抗体を、結合イベントの視覚化（例えば蛍光分子による標識）や、その他の方法による検出のための分子（例えば酵素）に、直接的に結合させます。

細胞表面に局在する抗原を探索する場合には、細胞の固定は推奨されません。固定の工程によって、対象の抗原が抗体から隔離されてしまう可能性があるためです。したがって、データ取り込みが完了するまで、未固定の細胞を生存可能な状態で維持するため、効率的に作業する必要があります。これらの一次標識体の使用によって、対象の抗原への結合と、検出用の蛍光プローブによる標識がシングルステップで達成されるため、染色工程を短縮可能です。

間接検出法

間接検出法では、一次抗体を対象の抗原に結合させた後、一次抗体の免疫動物のアイソタイプに特異的な蛍光プローブ標識二次抗体によって、対象の抗原を検出します。精製した一次抗体と、多様な波長（または「色」）の蛍光プローブで標識された、一次抗体特異的な二次抗体を用いることによって、抗体ライブラリーのモジュール性を高めることができます。

注意

細胞を*in vivo*の組織または*in vitro*培養条件から取り出すと、受容体やその他の対象の表面抗原が自然に内部に移行します。これを最小化するために、未固定の細胞は氷上および／または4°Cで保管する必要があります。

蛍光色素で標識された抗体には、光から保護して保管、使用するという追加の留意事項があります。

ビオチン化検出法

3つ目の方法であるビオチン化検出法では、細菌由来のタンパク質であるアビジンを利用します。アビジンという名称は、内因性リガンドであるビオチンに対して天然の結合活性 (avidity) を有することに由来します。ビオチン - ストレプトアビジン複合体は、「分子マジックテープ」と呼ばれることもあります。これは、この複合体が、免疫学的検出法、プロテオミクス、アフィニティー精製、核酸 - タンパク質相互作用の解析において、2つの分子を接着する研究ツールとして広範に用いられているためです。多様なビオチン化一次抗体や二次抗体が広く市販されています。フローサイトメトリーによる検出は、蛍光プローブに結合したストレプトアビジンとインキュベーションすることによって行います。ビオチンにはストレプトアビジンが結合可能な部位が4つあるため、シグナルが増幅され、一次抗体の各結合イベントにつき蛍光シグナルが4倍に増加する可能性があります。

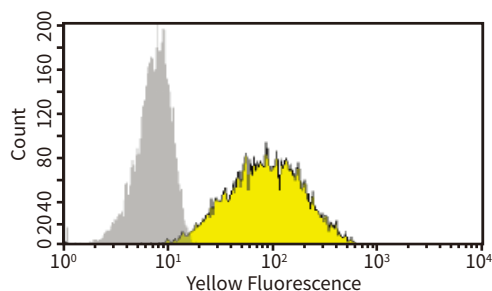


図 20.

T10B9 primary Milli-Mark™ anti-CD3- PE antibody (黄色のヒストグラム、カタログ番号FCMAB168P)を用いたヒト末梢血単核細胞 (PBMC) の染色。未染色のPBMCは、灰色のヒストグラムで示されています。Guava easyCyte™ 8HTフローサイトメーターを用いて細胞を解析しました。



注意

未固定の細胞は脆弱で、容易に破壊されます。フローサイトメーターによるデータ取り込みまで未固定の細胞を生存したまま維持するためには、穏やかで迅速かつ効率的なステップを用いることが重要です。

	利点	欠点
直接検出法	1回のインキュベーションで、対象の抗原への結合や、結合した抗体の検出を行うことができるため、時間を節約し、細胞生存率を維持することができます。	マルチカラーバレットの多用途性は、経済的に入手・保存可能な「色」の異なる抗体の選択によって制限されています。
	交差反応性や抗体の非特異的結合が限定的なので、抗体産生動物種の選択肢が広がっています (例えば、マウスで産生した一次標識抗体を使用し、マウス細胞の抗原を検出することも可能です)。	発色団により標識された抗体は光線への曝露を確実に避ける必要があります。
間接検出法	利用可能な抗体が少ない場合でも、マルチカラー「チャネル」選択のモジュール性が高くなっています。	2回のインキュベーションが必要となるため、生細胞で実験を実施する場合はデータ取り込みの完了前に未固定の細胞がアポトーシスのリスクに晒されないように、作業効率を高める必要があります。
		二次抗体による非特異的結合の可能性があるため、使用する各免疫動物や抗体のアイソタイプに対して陰性「アイソタイプコントロール」を用いる必要があります。
ビオチン化検出法		抗体の選択に際しては、一次抗体がサンプルを採取した種と同一の種で産生されたものではないように注意する必要があります。これは、二次抗体が、一次抗体と内因性標的の両方に結合してしまうためです。
	一次抗体と標的抗原の各結合イベントあたりの蛍光シグナルが増加する可能性があります。	多重染色実験では二次抗体が意図しない一次抗体との交差反応をする偽陽性のリスクが高くなります。
		アビジン - 蛍光プローブ複合体が、生体サンプル中の内因性ビオチンに結合すると、偽陽性シグナルのリスクが高まります。サンプル中の細胞の性質によっては、内因性ビオチンのブロッキングが必要になる可能性があります。

フローサイトメトリーにおける主なステップは次の通りです：

- ・ サンプル調製
- ・ ブロッキング
- ・ 抗体インキュベーション
- ・ データ取り込み

下記、細胞内標的に対する固定と膜透過の必要な手順です。

3.8.4 サンプル調製

単細胞懸濁液の調製が可能であれば、どのような細胞でもフローサイトメトリーによって検討することができます。

- ・ 通常、*ex vivo*細胞集団の調製には、解剖したばかりの組織を機械的な細胞分散方法によって穏やかにホモジナイズし、細胞外マトリックス、デブリス、無関係な細胞集団を除去するために密度勾配遠心法によって異なる細胞のタイプを分離します。
- ・ 接着性細胞株は、酵素溶液かカルシウムキレート剤を用いて、細胞培養器の表面から剥離しなければなりません。酵素分散溶液の使用ではこの過程で標的が誤って消化されることを避けることが最善です。
- ・ 懸濁培養細胞の場合は、計数と生存率の評価以外には必要ありません。全血は白血球抗原が標的の場合には、希釈されおだやかに溶血されることがよくあります。

細胞数／力価は、懸濁液中の生細胞を指します。ここで、Scepter™ や Muse® などの自動セルカウンターに、死細胞／デブリスを除去するゲーティングを適用すれば生細胞数を直ちに測定可能です。別の方法に、トリパンブルー染色した既知の容量（血球計数器による容量など）中の全細胞数と視細胞の数を顕微鏡で計数し、生存率を判定する手法があります。生細胞のインタクトな細胞膜はトリパンブルー色素を取り込まないため、色素を取り込んだ死細胞を容易に特定することができます。

チューブベースのフローサイトメトリーでは、サンプルの力価が $0.5 \sim 1 \times 10^6$ 細胞であれば、350～500 μL のバッファーに再懸濁すると、単細胞懸濁液が得られます。マルチウェルプレートを用いるハイスループットサイトメーターに適切な

サンプル量は、通常各ウェルにつき生細胞が $1 \times 10^5 \sim 0.5 \times 10^6$ 個の範囲です。Guava easyCyte™ などのマイクロキャピラリー方式のフローサイトメーターでは、各チューブまたはプレートのウェルにつき約10,000～100,000個の細胞が用られます。

細胞サンプルの各操作後には、再ペレット化の前に細胞を洗浄するため、フローサイトメトリー用のチューブ／プレートのウェルを洗浄バッファで満たし、緩やかに攪拌／ボルテックスします。

未固定の細胞は通常300～500×gで遠心分離しますが、固定細胞の場合は若干強めにします。ただし、新鮮なサンプルと固定されたサンプルのいずれであっても、ペレット化に十分な遠心力を用いる必要があります。しっかりとしたペレットを得るには、通常は1回5分の遠心分離で十分です。このようなペレットが得られれば、チューブを軽く振るか、逆さまにしたマルチウェルプレートを吸収性パッドの上で軽く叩くと、迅速かつ効率的にデカントすることができます。やわらかいペレットを形成している細胞では、遠心分離後、慎重に上清をピペットで吸引してください。ペレットの再懸濁には、チューブかウェルの底部を試験管立てにあてて数回かいてならします。こうすると、次のインキュベーション、洗浄、データ取り込みのステップの前に、ペレットをすぐに再懸濁することができます。

3.8.5 ブロッキング

一次抗体の懸濁細胞への非特異的結合を防ぐために、抗Fc受容体抗体クローンもしくはサンプルに特異的な全Fc受容体クラス（大抵Fcブロックと呼ばれています）に特異的なクローンのカクテルがサンプルに添加される場合があります。多くの細胞型、特に白血球上に存在するFc受容体に対する抗体プローブの定常（Fc）領域の意図しない結合を防ぎます。Fcブロックは、通常は非常に少量（約10 μL ）を洗浄した細胞に加えます。これは、染色用の抗体希釈液を、ブロッキングインキュベーションの終了時に、洗浄ステップを行わずに直ちに添加するためです。Fcブロックは一次抗体処理の全期間非特異的な抗体の結合を確実に阻害します。同時に洗浄と再攪拌のステップをなくすことによって染色過程の効率をよくします。

💡 テクニカルヒント

細胞表面の抗原を意図せず切断してしまわないように、可能な場合は必ず非酵素的方法を用いて培養器の表面から接着細胞を剥離しましょう。非酵素的方法によって接着細胞を剥離することができない場合は、トリプシンなどの全般的なプロテアーゼではなく、接着性タンパク質に選択的な酵素（Accutase™ enzyme、カタログ番号SCR005など）を選択することが重要です。

💡 テクニカルヒント

蛍光色素結合抗体においては、光から保護して保管、使用するという追加の留意事項があります。

3.8.6 抗体処理

一次抗体処理

抗体をベースとした免疫組織化学などのアプリケーションとは異なり、フローサイトメトリーにおける抗体の希釈は、バッファー容量あたりの抗体の質量ではなく、サンプル中の細胞数あたりの抗体の質量に基づくことが通常です。その他のアプリケーションと同様に、至適な濃度は経験的に判定しなければなりません。通常希釈率は、一次抗体でも二次抗体でも 10^6 細胞あたり1~3 μg です。抗体はフローサイトメトリー用アッセイバッファーで希釈してください。(細胞内のアプリケーションには、細胞内の標的へのアクセスを維持するために透過バッファーで希釈する必要があります。)非常に少量の反応容積(50-100 μL)での染色は、懸濁液中の細胞へ抗体のアクセスを改善します。インキュベーション時間の終了時には、細胞を染色またはアッセイバッファーで3回洗浄し、結合しなかった一次抗体を除去します。

💡 テクニカルヒント

一次抗体を蛍光プローブで標識している場合には、褪色によるシグナルの損失を防止するために、抗体インキュベーションステップを暗所で実施しなければなりません。

二次抗体処理

間接検出法を用いる場合には、使用した各一次抗体のアイソタイプに特異的な適切に希釈した二次抗体で処理します。マルチカラー検出実験では、各標的からのシグナルを識別可能にするために、各二次抗体について波長や色が十分に異なる蛍光プローブを選定しなければなりません。2色あるいは3色以上の標識抗体を利用するマルチカラー解析においては、各蛍光チャネルからの真のシグナルを定義し、隣接するチャネルとのシグナルの交差を除去す

るために、通常はスペクトル補正(コンペンセーション、ほとんどのサイトメーター制御ソフトウェアの機能として実装されています)が必要です。二次抗体とのインキュベーションは、光に敏感な蛍光プローブを保護するために、暗所で20~30分間行います。前回と同様に、サンプルは氷上で維持し、4°Cで遠心分離します。

ストレプトアビジン処理(必要な場合)

一次または二次抗体がビオチン化されている場合には、最終処理ステップを、蛍光プローブに結合したアビジン、通常はストレプトアビジンを用いて実施します。氷上、暗所で15~30分間インキュベーションした後、結合しなかったストレプトアビジン-蛍光プローブを除去するために3回洗浄します。その後サンプルを適切な容量のアッセイバッファー(通常はサンプルあたり200~500 μL)に再懸濁し、データ取り込みまで遮光し、氷上で維持します。

蛍光色素

フローサイトメトリーで用いられる抗体の多くは、蛍光色素で直接標識されています。しかし、数多くの非標識の一次抗体も、標識した二次抗体と組み合わせて日常的に使用されています。フローサイトメトリーにおいて用いられることが多い2種類の蛍光色素は、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)とフィコエリスリン(PE)です。これらの比較的明るい蛍光色素は広く入手可能であり、488 nmレーザーで励起され、シングルレーザーを搭載したフローサイトメーターに対して”第一世代”の蛍光色素として最適化されています。蛍光色素の化学的理解やフローサイトメーターの進歩によって、複数の細胞の標識や選別を同時に行うことが可能となっています。

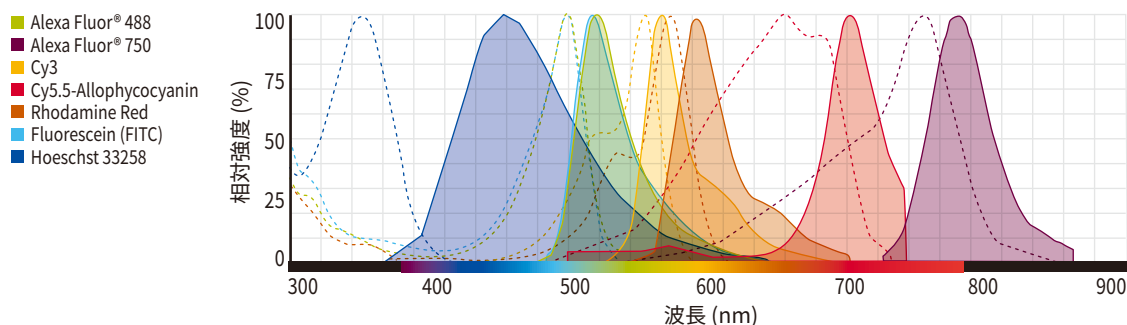


図 21.

発光スペクトルが重複しない多様な蛍光色素によって、マルチパラメータフローサイトメトリーが可能になります。

フローサイトメトリーにおける適切なコントロール

対象の細胞に加え、フローサイトメトリー実験には必ず以下のコントロールを用いる必要があります

1. 未染色のサンプルを1つ以上用いて、試験サンプルと同時に各ステップでバッファーとインキュベーションします。未染色のサンプルは、流量の至適化、前方および側方散乱光の検出器における電位設定、実験に使用する各蛍光検出器のベースライン電位の設定のため、データ取り込み時に必要です。
2. 適切な陰性コントロールサンプルは、試験サンプルと同一の細胞/組織で、一次抗体がアイソタイプコントロールと置き換えられたものです。このコントロールは、検出された蛍光シグナルが、二次抗体によるサンプル細胞への直接的な非特異的結合によるものであるかどうかを判定し、蛍光シグナルからこの「バックグラウンド」を引き算するために必要です。代替の陰性コントロールには、試験サンプルと同一のサンプルから一次抗体を省略したものがありますが、すべての場合に適用可能なコントロールになるわけではありません。
3. 可能な場合には、対象の各抗原の存在が確認されている細胞を陽性コントロールとし、試験サンプルと同時に処理します。マルチチャンネル実験では、使用する各波長チャンネルに対して、対応する単色の陽性コントロールサンプルを用い、試験サンプルと同じ抗体とインキュベーションしなければなりません。通常、このためにはコントロールビーズが販売されており、これを製造業者の指示に従って使用します。ただし、標的抗原を発現していることが確実である場合には、細胞を単色の陽性コントロールとして使用することもできます。

固定および保存

表面抗原の染色が完了した後、データ取り込みのために再懸濁する代わりに、細胞を1~4%パラホルムアルデヒドを含むリン酸緩衝食塩水で固定する場合があります。こうすると細胞を4°Cでオーバーナイト保存可能になり、染色後すぐにサンプルのデータ取り込みを行うことができない場合に有用です。氷上で20分間パラホルムアルデヒド固定をした後、4°Cで保存される前に固定液は希釈されている必要があります。(固定液中で細胞を保存しないでください。これは不要な処理であり、バックグラウンドを著しく増加させます。)

可能であれば染色後すぐのデータ取得が推奨されますが、遮光下4°Cで保管されている固定済みの細胞は、固定後48時間までデータ取得が可能です。

細胞内の標的:透過処理

対象のタンパク質が細胞内にある場合には、表面染色後に細胞を固定し、構造強度を高めます。こうすると、抗体が細胞内の抗原に到達できるようにするために必要な透過処理に、細胞が耐えられるようになります。前述の通り固定・洗浄した細胞に対して、0.5%の界面活性剤を含有するリン酸緩衝食塩水で、室温15分以内のインキュベーションによって、透過処理を行います。その後、界面活性剤溶液を希釈し、1回洗浄します。細胞内標的だけを標識する場合は、細胞は収集と懸濁の直後に固定され、その後、抗体染色のためにすぐに膜透過するか染色まで4°Cで保存します。透過処理にはサポニンなどの非イオン性界面活性剤が推奨されています。透過処理は、抗体やストレプトアビジンを用いるすべてのステップを通して維持されなければなりません。このため、その後の染色処理を通して、蛍光プローブとのインキュベーションステップが完了するまで、0.3%界面活性剤を染色バッファーに入れるようにします。フローサイトメリーによる細胞内抗原の検出のその他の手順については、前述の原則や手順に従います。直接検出法、間接検出法、またはシグナル増幅を伴う直接/間接検出法が使用可能です。



テクニカルヒント

サブセットの細胞の機能解析を可能とするために、表面抗原と細胞内抗原の染色を組み合わせることもよくあります。アプリケーションには、以下のような例があります:

- 全血を採取し、密度勾配遠心分離法によってPBMCを分離します。
- PBMCを、遺伝毒性が疑われる化合物を用いて処理します。
- CD4、CD8、CD19、NK1.1などの表面マーカーを染色します。
- 固定し、抗γH2.AX抗体で染色し、リンパ球DNAにおける二本鎖切断の誘導を評価します。

3.8.7 データ取得

フローサイトメーターには、各細胞が検出器を通過する際に粒子の特性に基づき產生されるシグナルを取得・変換するために必要なソフトウェアが付属しています。また、これらのソフトウェアプログラムには、実験の構築を補助するためのプログラムも含まれていることが多く、これは複数の標本やドナーによる多様なサンプルを解析する場合に特に重要となります。流路系のセットアップ後に、未染色の細胞を用いて前方および側方散乱光検出器を設定し、未染色の細胞を陽性コントロールと比較して蛍光検出器を調整します。また、ユーザーが、各サンプルについて均一な数の「イベント」または粒子／細胞シグナルを取得するようにソフトウェアを設定します。マルチカラー実験では、実験で用いる蛍光プローブのスペクトル波長の重複を考慮するため、蛍光補正パラメータの設定も重要となります。蛍光補正（コンペンセーション）では、各蛍光プローブのスペクトルを校正し、スペクトルの重複による近接したチャンネルからのシグナルを減算します。

シグナルパラメータのヒストグラムは、イベント数に対してプロットされた相対的な蛍光強度を表します。この表示の単純性が、ヒストグラム表示がよく用いられる主な理由となっています。アポトーシス細胞を非アポトーシス細胞と識別するなど、単純なアッセイに理想的です（図22）。

同時に収集した複数のパラメータを比較したい場合には、より複雑な2次元、さらには3次元ダイアグラムが必要となります。このようなダイアグラムでは、X軸対Y軸の表示で、1つのパラメータを別のパラメータに対してプロットします（図23）。

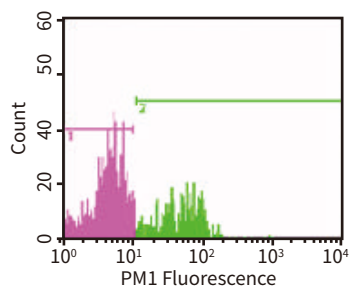


図 22.

アポトーシス誘導剤であるカンプトテシンで処理し、その後 Guava® TUNEL apoptosis assay (カタログ番号4500-0121) で固定・染色したHL-60細胞のフローサイトメトリーデータです。カンプトテシン処理したサンプルにおけるアポトーシス細胞（緑）は未処理で健康な非アポトーシス細胞（紫）を識別するゲートを最初にセットすることで同定されました。

フローサイトメトリーにおける細胞の標識の多くは特定のサブクラスの細胞に特異的な抗体を用いて行なわれます。通常は、生細胞を分別するため、外部の細胞エピトープに特異的な抗体を用います。細胞内のエピトープに対する抗体の使用は、抗体が浸透できるように透過処理された固定細胞に限られます。弊社では、様々な細胞のタイプに特異的な多数のポリクローナル抗体やモノクローナル抗体を提供しています。細胞のタイプに特異的な同一の表面抗原を認識するモノクローナル抗体のグループの多くには、国際会議によって表面抗原分類（CD）番号が割り当てられています。例えば、ヘルパーT細胞の抗原部位のエピトープを認識するモノクローナル抗体は、まとめてCD4として知られています（図24）。

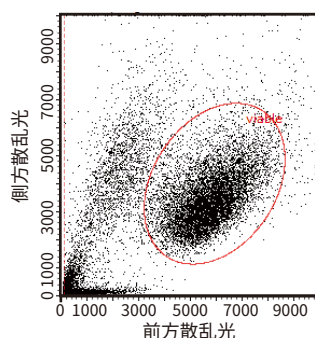


図 23.

この2パラメータフローサイトメトリープロットは、細胞の光散乱特性を用いて対象の細胞集団を検出する方法を示しています。ここでは、サイズ（前方散乱光）と細胞内の複雑性（側方散乱光）を用いています。その後、ユーザーが設定・適用するゲートや領域を用いて、解析の焦点を合わせるために対象の分集団を検出します（ここでは、赤色の楕円形で可能性のある生細胞集団が表されています）。

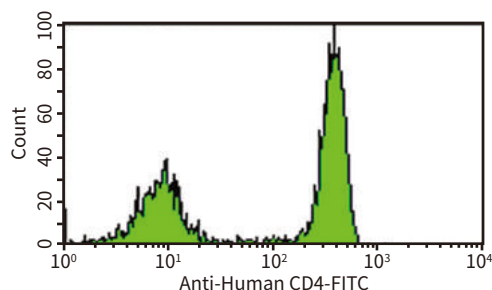


図 24.

抗ヒトCD4-FITC抗体で染色したヒトリンパ球のフローサイトメトリー解析。CD4を発現している細胞（右側のピーク）が、CD4陰性細胞（左）に対して識別されました。CDマーカーの発現は、血液標本によって異なる可能性があります。

💡 テクニカルヒント

- ・ 染色などの処理の前にはサンプルを十分に混合しますが、過剰に泡立てないようにします。
- ・ 洗浄バッファーに微量の沈殿物が認められる場合には、ボトルを温浴槽に30分間入れ、その後機械的なボルテックス装置で内容物を混合します。
- ・ 細胞染色や解析を最も効果的に行うためには、使用前に試験細胞の生存率が良好であることを確認しましょう。
- ・ 特定の培養細胞では、細胞ペレットが固定後に濁りを伴った透明になり、見えにくくなってしまうことがあります。フローサイトメトリー解析のために少量の細胞を採取するのであれば、すべてのステップを小型の採取チューブ（例、マイクロ遠心チューブ）の中で実施することをお勧めします。
- ・ 複数のキットのロットの試薬を混合または交換しないようにします。

3.8.8 トラブルシューティング:

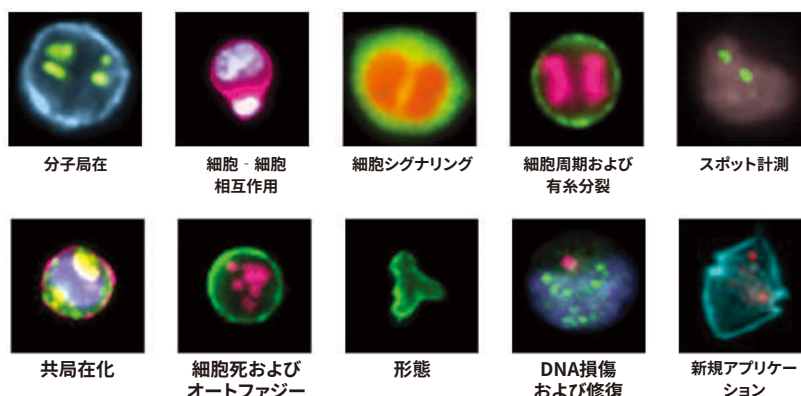
問題	原因	推奨される対策
データ取得速度が劇的に低下した	装置の流路が詰まっている	サンプルを希釈し、解析される細胞数を減らします。細胞濃度が高すぎると詰まりが生じ、アッセイ中に混乱が生じる恐れがあります。
		何回も使用した後であれば、標準的なフローサイトメーターでは流路系を洗浄する必要があります。標準的な洗浄手順を実施し、アッセイ中または後に液体システムを清掃します。これによって、一定の流れが生じる場所に沈着等が形成されることが防止されます。
		キャピラリー流を保つためにフローセルはきれいで詰まりがないことを確認してください。洗浄やメンテナンスは製品取扱説明書に従ってください。
細胞が凝集してしまう	細胞が凝集してしまふ	付着または接着性の細胞では、細胞凝集が生じることがあります。セルストレーナー（カタログ番号 SCNY00060; 60 µm）の使用も、細胞凝集を阻止する助けとなります。
シグナルが失われている、またはシグナルが認められない	サンプル中の細胞数が十分ではない	洗浄ステップでは、細胞が失われることがよくあります。上清を流すあるいは吸引して除く前に細胞ペレットがしっかりとれていることを確認してください。ペレットへ接触しないよう、吸引中はプレートやチューブの角度を変えてください。
	抗体が十分ではない	シグナルの欠如は、染色手順で想定よりも多量の抗体を用いる必要性を示している場合があります。理想的な染色濃度を把握するため、一部の細胞のタイプでは、さらに抗体の力価を測定する必要があるかもしれません。
バックグラウンドおよび/または細胞の非特異的な染色	抗体が過剰である	抗Fc受容体抗体または血清ベースのブロッキング剤であらかじめ細胞をブロッキングしてください。抗体処理中もブロッキングを維持します。特異的な染色の適切な濃度を見つけるために抗体の希釈系列をテストしてください。
実験ロット間の結果のばらつき	細胞生存率の変化	実験に用いる培養細胞をモニタリングし、解析対象の細胞生存率や細胞数が安定していることを確認します。
	機器の校正の変化	使用前に、日常的に機器の品質確認（例、キャリブレーション）を実施します。

知っておくと便利なテクノロジー

画像データ取得による高感度・高分離能フローサイトメーター

Amnis® Imaging Flow Cytometers

Amnis イメージングフローサイトメーターは、個々の細胞やサブpopulationの詳細な解析や画像データを提示する革新的な装置です。免疫学から創薬、さらには寄生虫学まで、弊社のイメージングフローサイトメーターは、細胞間相互作用、形態解析、DNA損傷および修復等の研究において洞察性に富んだデータを生み出します。研究室の研究ニーズや予算に見合うように、現在2種類のプラットフォームImageStream® XおよびFlowSight®をご用意しております。



詳細はこちらをご覧ください。

<http://www.sigma-aldrich.com/flow-cytometry-jp>

3.9 機能阻害および刺激アッセイ

はじめに

特異的な抗体 - 抗原相互作用によって、標的タンパク質の機能的変化が生じる可能性があります。これらの相互作用は、「中和抗体」のように抗原を中和したり、酵素の活性部位を阻害または変化させたり、結合してタンパク質の立体構造変化を誘発したりする場合があります。抗体が機能アッセイで実際に作用するかどうかは、エピトープがタンパク質のドメインや活性部位の三次元立体構造に関連するかどうかに依存します。このため、多数の低分子阻害因子／活性化因子のデザインとは異なり、タンパク質の機能を特異的に変化させる抗体のデザインを容易に予測することはできません。

低分子化合物と同様に、抗体も以下のようにタンパク質の機能を変化させる場合があります：

1. 直接的な活性部位への結合

a. 反応



b. 阻害

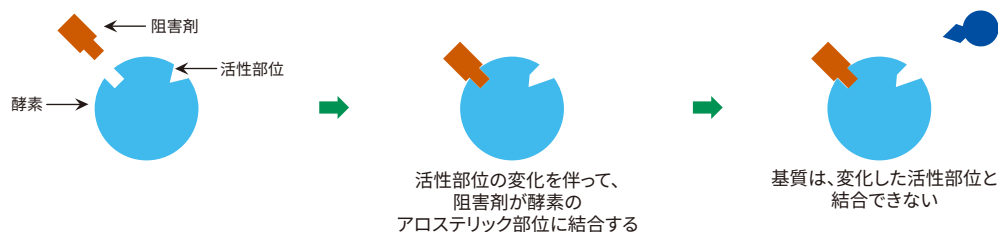


2. アロステリック結合が誘導する立体構造変化

a. 反応



b. 阻害



3. 立体障害

a. 反応



b. 阻害



しかし、多数の低分子化合物とは異なり、抗体は細胞膜透過性が低いため、生細胞の機能アッセイは細胞外エピトープに限定されています。非透過性でありながら特異的であるという抗体の特性は、細胞表面タンパク質の標的阻害または刺激において大きな利点となります。リガンド結合部位またはその附近の抗原性の高いエピトープに対して多数の抗体を設計し、受容体 - リガンド結合の立体的阻害を引き起こすことができます。このような研究では、通常はチャネルまたは受容体の非活性化や、細胞接着などにおいて生じるタンパク質 - タンパク質結合界面の阻害を標的とします。下図の例を参照してください。

一部の受容体に結合する抗体は、抗体 - 受容体複合体が迅速に細胞内部に移行し、分解されるため、非常に有用です。これらの抗体をサポニンなどの毒素に結合させると、複合体が細胞内に移行した後、毒素が内部で遊離し、細胞を死滅させることができます。これは脳内の特定のタイプの細胞を除去するための古典的な方法です。例として、コリン作動性ニューロンは、適切な抗体 - 毒素標識体を用いてp75 NGF受容体を標的とすることにより、選択的に排除することができます。

中和抗体は、免疫動物において抗薬物抗体 (ADA) 反応を誘発する可能性がある巨大分子によるバイオ医薬品の安

全性や有効性の機能解析に重要です。規制当局は、バイオ医薬品の試験ガイドラインを発行しており、中和抗体の有無について、非臨床および臨床試験において機能アッセイを実施するよう推奨しています。結果として、中和抗体に対する新規アッセイの開発が急速に進められています。



注意

市販されている多くの抗体は、アジ化ナトリウムなどの保存剤を含有しており、生細胞に有毒です。生細胞の機能研究では、再懸濁した抗体を、透析または限外ろ過をして保存剤を除去するか、製造業者から保存剤を含まない抗体を購入しましょう。

機能	作用機序	参考資料	抗体例	カタログ番号
免疫損傷	コリン作動性細胞の細胞死を誘発	Wiley, R. (2001) Methods Mol. Biol. 169:217.	Anti-p75 NGFR-Saporin conj.	MAB390-25UG
酵素機能の阻害	MMP-2の活性化を阻害	Chen, H. <i>et al.</i> (2012) J. Biol. Chem. 287:17109.	Anti-MMP-2 Proform	MAB13405
受容体の阻害	TLR2の活性化を阻害	Sandor, F. <i>et al.</i> (2003) J. Cell Biol. 162:1099	Anti-TLR2	MAB3737
基質への細胞接着を阻害	ECMへの $\alpha\beta3$ 複合体の結合を阻害	Mao, Y. & Schwarzbauer, J. (2005) J. Cell Sci. 118:4427.	Anti- $\alpha\beta3$	MAB1976Z
細胞 - 細胞接着を阻害	インテグリン $\beta1$ /CD63の相互作用を阻害	Iizuka, S. <i>et al.</i> (2011) Mol. Cell Biol.	Anti-Integrin $\beta1$	MAB2253Z
リガンドの中和	<i>In vitro</i> および <i>in vivo</i> においてBDNFを中和	Finn <i>et al.</i> (1986) J. Neurocytol. 15:169.	Anti-BDNF	AB1513P
受容体を刺激	受容体の活性化によってアポトーシスを誘導	Trauth, B. <i>et al.</i> (1989) Science 245:301.	Anti-Fas	MAB3061

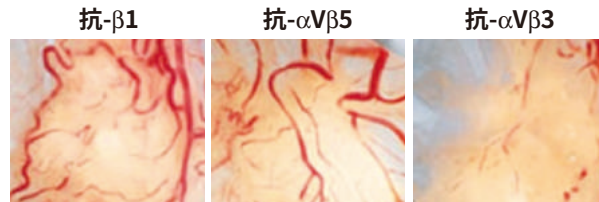
💡 テクニカルヒント

- 免疫原について知りましょう。機能的阻害に適切な抗体の選択は、エピトープ、対象の活性部位の三次元立体構造、抗体の結合活性によります。例として、インテグリン $\alpha\beta3$ による基質への結合を妨害するには、結合部位を標的とする抗体か、アロステリックに結合に干渉する抗体を選択します。後者の例としては、マウスモノクローナル抗体LM609が良く知られています。LM609は、RGDを含有するリガンドに対する細胞接着を阻害しますが、RGD結合部位と直接相互作用するわけではありません。その代わり、LM609はインテグリン $\alpha\beta3$ のアロステリックな阻害剤であるとみられており、 αV と $\beta3$ サブユニットの翻訳後結合によって生じる立体構造的エピトープに結合します。
- 生細胞アッセイでは、抗体は保存剤を含有しないものでなければなりません。保存剤を除去する必要がある場合には、限外ろ過または透析ベースのバッファー交換を行います。
- *In vitro*から*in vivo*へのプロトコルの外挿は困難であることが多く、通常は使用する抗体濃度を著しく上げる必要があります。*In vivo*の考慮点としては、内因性免疫原の存在、抗体の送達方法、組織構造、異物である抗体の添加に対する免疫動物による免疫応答があります。
- 生細胞を用いた機能アッセイでは、抗体の阻害のばらつきが大きい可能性があることから、十分なシグナルを得るために、細胞刺激応答が、 EC_{50} 抗原濃度で得られるバックグラウンドよりも5倍以上高い必要があります。実験を3回または4回実施することをお勧めします。
- 機能アッセイにおける抗体の性能は、IHCやELISAのような非機能的な免疫アッセイよりも、培地環境の変化による影響を受けやすくなっています。

知っておくと便利なテクノロジー

マウス抗インテグリン $\alpha\beta3$ による細胞接着の阻害

弊社は、200種類以上の機能的阻害または刺激抗体を提供しています。一例として、Anti-Integrin $\alpha\beta3$ Antibody, clone LM609は、RGD誘導性接着受容体であるビトロネクチン受容体 $\alpha\beta3$ 複合体と反応します。LM609は、ビトロネクチン、フィブリノーゲン、von Willebrand因子、ならびに合成RGD含有ペプチドに対するヒトメラノーマ細胞株 (M21) の接着を阻害することが実証されています (Cheresh, 1987)。ヒヨコの漿尿膜において、LM609は、bFGFおよびTNF α 誘導性血管新生を阻害するものの、既存の血管にはまったく影響を及ぼさないことが示されています (Brooks, 1994)。LM609は、RGDを含有するリガンドに対する細胞接着を阻害しますが、RGD結合部位と直接相互作用するわけではありません。その代わり、LM609はインテグリン $\alpha\beta3$ のアロステリックな阻害剤であるとみられており、 αV と $\beta3$ サブユニットの翻訳後結合によって生じる立体構造的エピトープに結合します。



ヒヨコの漿尿膜におけるMouse Anti-Integrin $\alpha\beta3$ (カタログ番号 MAB1976) による血管新生の阻害。写真は、以下の図1、2、4から許可を得て転用したものです: Brooks, P.C., Clark, R.A.F., and Cheresh, D.A. (1994) Science 264:569, © 1994 by the AAAS.

4

プロトコルの例

- 4.1 免疫沈降法
- 4.2 クロマチン免疫沈降法 (ChIP)
- 4.3 ウェスタンブロット
- 4.4 酵素結合免疫吸着検査法 (ELISA)
- 4.5 マルチプレックスビーズベース検出
- 4.6 免疫組織化学／免疫細胞化学
- 4.7 フローサイトメトリー
- 4.8 機能的阻害および刺激アッセイ

4.1 免疫沈降法

以下のプロトコールでは、免疫沈降法における抗原抗体複合体の形成のステップについて、詳細に説明しています。マイクロ遠心チューブに、以下の試薬を加えます：

1. 500 μ Lの2×免疫沈降バッファー (1% Triton® X-100、300 mM NaCl、20 mM Tris、pH 7.4、2 mM EDTA、2 mM EGTA、0.4 mM バナジン酸ナトリウム、0.4 mM PMSF、0.5% NP-40)
2. 200～500 μ gのトータルタンパク質溶解液 (2～5 mg/mLの溶解液を約100 μ L)
3. 精製抗体1～5 μ g。未精製の抗体を用いる場合には、以下の抗体の量に置き換えます。
血清：0.5～5 μ L
ハイブリドーマ組織培養上清：10～100 μ L
腹水：0.1～1.0 μ L
4. 再蒸留水を加えて1 mLにします。

5. 穏やかに混合し、氷上で1時間インキュベーションし、免疫複合体を形成させます。インキュベーション時間を延長すると、複合体の形成も増える可能性があります、非特異的なバックグラウンドも増える恐れがあります。

ヒント

- 記載されている抗体濃度は、開始点として推奨されているものに過ぎません。必ず、至適な抗体濃度を経験的に判定する必要があります。
- 陰性コントロールの反応に際しては、同等量のコントロール抗体を加えます。

4.2 クロマチン免疫沈降法 (ChIP)

ChIPのための細胞の調製

1. 必要に応じて、約80～90%コンフルエントな接着性の哺乳類細胞を、20 mLの増殖培地を入れた150 mmの培養ディッシュで刺激または処理します。細胞数の推定に用いるため、細胞のプレートは1枚余分に作製します。
2. 各150 mm培養ディッシュにつき、22 mLの1×PBS (10×PBS 2.2 mLと水19.8 mL) を調製します。氷上で保存します。これは洗浄に用いるため、氷冷されている必要があります。
3. 550 μ Lの37%ホルムアルデヒド (または1,100 μ Lの18.5%ホルムアルデヒド) を、20 mLの増殖培地に直接加え、架橋させます。穏やかにディッシュを揺らして混合します。
4. 室温で10分間インキュベーションします。
5. 10分間のインキュベーションの間に、PBSで1×プロテアーゼ阻害剤を調製します：各ディッシュにつき、2 mLの氷冷された1×PBSを別のチューブに入れ、10 μ Lの200×プロテアーゼ阻害剤カクテルIII (カタログ番号 535140, 539134)*を加えます。氷上で保存します。
※哺乳類細胞用プロテアーゼ阻害剤カクテルをご使用ください。
6. 各ディッシュに2 mLの10×グリシンを加え、過剰なホルムアルデヒドをクエンチします。
7. 揺らして混合し、室温で5分間インキュベーションします。
8. ディッシュを氷上に置きます。
9. 培地を吸引除去し、細胞を崩さないよう注意しながら可能な限りすべての培地を除去します。浮遊細胞を用いている場合には、8,000 × gで5分間遠心します。
10. 10 mLの氷冷された1×PBSを加え、細胞を洗浄します。1×PBSを除去します。
11. 1×PBSを除去し、再度洗浄します。
12. ステップ5でPBSを用いて調製した1×プロテアーゼ阻害剤カクテルIII (カタログ番号 535140, 539134) を2 mL加えます。
13. 各ディッシュから細胞を掻き取り、別のマイクロ遠心チューブに入れます。
14. 800×g、4°Cで5分間遠心し、細胞をペレット化します。

ChIPのための組織の調製

1. 未固定の新鮮な組織を望ましい方法で単離します。架橋の効率を改善するため、レーザー刃を用いて、豆粒ほどの小片をさらに小さく切断します (通常は1 mm以下)。別の方法としては、非ホルマリン固定パラフィン包埋 (non-FFPE) 凍結切片から得た組織を用いて、対象となるサンプルの小片を得ることもできます (Magna ChIP® G Tissue Kit manual、カタログ番号17-20000を参照してください)。
2. 組織を秤量し、50 mLチューブに移し、氷冷1×PBSで2回洗浄します。
3. 組織を20 mLの氷冷PBSに再懸濁し、550 μ Lの37%ホルムアルデヒド (または1,100 μ Lの18.5%ホルムアルデヒド) を加えて架橋させます。穏やかにディッシュを揺らして混合します。
4. 室温で10分間インキュベーションします。
5. その間に、PBSで1×プロテアーゼ阻害剤を調製します: 各サンプルにつき、2 mLの氷冷1×PBSを別のチューブに入れ、10 μ Lのプロテアーゼ阻害剤カクテルIII (カタログ番号 535140, 539134) を加えます。氷上で保存します。
6. 2 mLの10×グリシンを加え、過剰なホルムアルデヒドをクエンチします。
7. 加圧型細胞破碎装置 (粗調整用ペストル) を用いて、組織を数回ホモジナイズします。
8. 800×g、4°Cで5分間遠心し、細胞をペレット化します。

超音波処理の最適化およびDNA断片の解析

架橋されたDNAを200~1,000塩基対に断片化するために至適な条件は、細胞のタイプ、細胞濃度、それぞれの超音波処理器 (パワー設定やパルスの持続時間、回数を含む) によります。超音波処理の最適化に関するアプローチには、以下のような方法があります:

- A. 超音波処理器のパラメータを一定にしたまま、初期バッファー1 mLあたりの細胞当量濃度を変化させる。
- B. バッファー1 mLあたりの細胞当量濃度を一定とし、超音波処理のサイクルおよび/またはパワー設定を変化させる。
- C. 両方のアプローチを組み合わせる。

以下のプロトコールは、オプションAによる最適化について説明するものですが、これは一例にすぎません。

1. 前述の最初の章に従い細胞溶解液を作製しますが、細胞の量に対するバッファーの容量を変えて、3本の異なるマイクロ遠心チューブを作製します。これらのチューブは、1 mLあたり $5 \times 10^6 \sim 5 \times 10^7$ の範囲で、数段階の細胞当量濃度になるようにします。HeLa細胞では、約 4×10^7 細胞当量、または15 cmプレートが約4枚必要となります。
2. 以下の細胞溶解手順を進めます。各マイクロ遠心チューブには、約500 μ Lの細胞溶解液を入れます。

3. サンプルは、常に濡らした氷上で維持するように気を付けましょう。超音波処理によって発熱し、クロマチンが変性してしまいます。

細胞溶解 バッファーの容量	細胞密度	必要細胞数
500 μ L	5×10^6 /mL	2.5×10^6
500 μ L	2×10^7 /mL	1×10^7
500 μ L	5×10^7 /mL	2.5×10^7

4. 断片化前のDNAの解析のため、超音波処理の前に、各条件から 1×10^5 細胞当量を採取します。
5. 各細胞濃度について、各チューブを一定のサイクル数にわたり超音波処理します。装置の製造業者のガイドラインに従い、サイクルとサイクルの間は静止させます。例として、Misonix 3000装置とNo. 419マイクロチッププローブを用いる場合、15秒のパルスを6回行い、パルス間隔は50秒、パワー設定は6にします。チューブは常に冷やしておきます。
6. 各条件の超音波処理したクロマチンから、 1×10^5 細胞当量 (濃度の低いサンプルから高いサンプルの順にそれぞれ20 μ L、5 μ L、2 μ L) を、新しいチューブに移します。
7. すべてのサンプル (断片化前のサンプルと断片化後のサンプル) に、最終容量が50 μ Lになるように溶出バッファーを加えます。
8. 1 μ LのプロテイナーゼKを加え、62°Cで2時間インキュベーションします。
9. 10 μ Lおよび20 μ Lを、100 bpのDNAマーカーと共に1~2%アガロースゲルで電気泳動します。アプライ量を変えることで、過少または過剰な泳動を回避する助けとなります。
10. どの断片化条件で、DNAが200~1,000 bpの範囲でスミアとなっているかを観察します。
11. 観察したDNAが望ましいサイズの範囲にないことが示された場合には、再度断片化条件の最適化を行います。一度至適条件を決定した後は、その後のクロマチン免疫沈降実験においても、マイクロ遠心チューブあたりの細胞濃度や溶解液の容量を変えないことをお勧めします。

DNA精製

(以下のプロトコールは、Sambrook, *et al.*, 2006から転用したものです。)

1. サンプルを、最大スピードで5分、室温で遠心分離します。
2. 上清を新しいマイクロ遠心チューブに移します。
3. スピニングカラムを用いてDNAを精製します。溶媒抽出については、ステップ4に進んでください。
4. 核酸サンプルをポリプロピレンチューブに移し、等量のフェノール/クロロホルム混液を加えます。フェノールがpH 7.8~8.0に適切に平衡化されていない場合には、核酸が有機相に分配されやすくなります。
5. 乳濁液が形成されるまで、チューブの内容物を混合します。
6. 混合液を、チューブが耐荷可能な最大速度の80%で、室温で1分間遠心分離します。有機相と水相がよく分離しない場合には、時間を延長して再度遠心分離します。
7. 通常は、水相が上になります。ただし、塩 (>0.5 M) またはショ糖 (>10%) によって水相の密度が高い場合には下になります。有機相は、平衡化の際にフェノールに添加した8-ヒドロキシキノリンによって黄色になっているため、容易に特定することができます。
8. ピペットを用いて、水相を新しいチューブに移します。少量 (<200 μ L) の場合は、ディスポーザブルチップを付けた自動ピペットを用います。界面および有機相を廃棄します。
9. 有機相と水相の界面にタンパク質が見られなくなるまで、ステップ1~4を繰り返します。
10. 等量のクロロホルムを加え、ステップ2~4を繰り返します。
11. エタノールを用いた標準的な沈降法によって核酸を回収します。

4.3 ウェスタンブロット

標準的なウェスタンブロットのプロトコールでは、電気的トランスファー後にブロットしたタンパク質を免疫学的に検出します。(トランスファー後にメンブレンを乾燥させた場合には、免疫学的検出法に進む前にブロットをメタノールで5分間十分に濡らします。) メンブレン上のタンパク質が転写されていない部分には、最適化した試薬によるブロッキングが必要です。この方法の欠点は、ブロッキングを要することと合計所要時間が4時間におよぶことです。時間を節約可能な代替となる免疫検出プロトコールについては、弊社のSNAP i.d. 2.0システム (50ページ) を参照してください。長所としては、標準的免疫検出法は新しいサンプルの最適化をそれほど必要としないことが挙げられます。

必要な溶液

- 一次抗体 (対象とするタンパク質に対して特異的な抗体)
- アルカリホスファターゼ (AP) またはホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) で標識された二次抗体 (一次抗体に対して特異的な抗体)
- 酵素標識に適切な検出用基質
- リン酸緩衝食塩水 (PBST) : 10 mM リン酸ナトリウム、pH 7.2、0.9% (w/v) NaCl、0.1% (最大) Tween®-20
- TBST : 10 mM Tris、pH 7.4、0.9% (w/v) NaCl、0.1% (最大) Tween®-20
- ブロッキングバッファー : 1% (w/v) BSA (ウシ血清アルブミン)、0.05% Tween®-20
- Milli-Q® 水

ヒント

- 弊社の疎水性PVDFトランスファーメンブレン Immobilon®-P^{SQ} は孔径が小さく (0.2 μ m)、Immobilon®-P (0.45 μ m) よりも表面積が大きくなっています。Immobilon®-P^{SQ} ではバックグラウンドが高くなることが予測されるため、ブロッキングや洗浄のステップを適切に調整する必要があります。
- ブロッキング溶液中のホスファターゼが、ブロットされたタンパク質を脱リン酸化してしまう場合があります。
- アジ化ナトリウムはHRPの活性を阻害するため、バッファーには使用しないようにします。
- ブロッキング中やその後は、常にブロットの乾燥を避けるようにします。
- 1枚以上のブロットを容器に入れる場合、バッファーの容量が不十分だとブロットがくっついてしまうことがあります。
- スキムミルクは、ビオチン - アビジンシステムに用いることはできません。
- 通常、発色検出法の感度は、化学発光検出法よりも一桁以上低くなります。
- 非特異的なシグナルが高い場合は、一次抗体をさらに希釈するか、アプライするタンパク質の量を減らすと緩和される場合があります。

ヒント



- ・トランスファーメンブレン Immobilon®-FL は、乾燥した状態でも湿った状態でも蛍光シグナルの取得が可能です。
- ・全体的なバックグラウンドが高い場合には、酵素標識した二次抗体をさらに希釈すると、S/N比が改善される場合があります。

必要な装置

- ・プロットを入れるために十分な大きさがある浅いトレイ
- ・ガラスプレート
- ・プラスチック製ラップフィルム (例: サランラップ)、フリーザーバッグまたはシートプロテクター
- ・オートラジオグラフィーフィルムとカセット
- ・暗室
- ・オートラジオグラフィーフィルム処理装置

準備

1. 一次抗体をブロッキング溶液で至適濃度に希釈します。
2. 二次抗体をブロッキング溶液で至適濃度に希釈します。
注: メンブレン1 cm²当たり0.1 mLの抗体溶液 (一次および二次) に十分な量の溶液を調製してください。

抗体インキュベーション

1. プロットをブロッキング溶液に入れ、攪拌しながら1時間インキュベーションします。
2. プロットを一次抗体溶液内に配置し、攪拌しながら1時間反応させます。溶液が、メンブレン表面全体を自由に移動できるようにしてください。
3. プロットをPBSに入れ、10分間洗浄します。新鮮なバッファーを用いて洗浄をさらに2回繰り返します。
4. プロットを二次抗体溶液に入れ、室温または37°Cで攪拌しながら1時間インキュベーションします。
5. プロットをPBSに入れ、10分間洗浄します。新鮮なバッファーを用いて洗浄をさらに2回繰り返します。
6. 発色検出法、化学発光検出法、または蛍光検出法のいずれかを行います。

発色検出法

1. メーカーの説明書に従って基質を調製します。
2. プロットを清浄な容器内に配置し、メンブレンの表面が完全に覆われるまで基質を添加します。軽く攪拌しながら10分間、またはシグナルが希望するコントラストに達するまで反応させます。
3. プロットをMilli-Q® 水で洗浄して反応を停止します。
4. 減衰を最小限に抑えるために、直接光を避けてプロットを保管します。プロットは、乾燥状態で保管可能です。

化学発光検出法

1. メーカーの説明書に従って基質を調製します。
2. プロットを容器内に配置し、メンブレンが完全に覆われるまで基質を添加します。1分間反応させます。
3. 余分な基質を廃棄します。
4. プロットを清浄なガラス板に載せ、プラスチックラップで包みます。
注: サイズに合わせて切ったシートプロテクターやフリーザーバッグを用いることもできます。
5. 気泡を残さずゆっくりと取り除きます。
6. 暗室内で、ラップされたメンブレンをフィルムカセット内に配置します。
7. 1枚のオートラジオグラフィーフィルムを最上部に配置して、カセットを閉じます。
8. フィルムを露光します。最適な露光時間を決定するには15秒〜30分の露光を複数回行う必要があります。1〜5分が一般的です。

蛍光検出法

必要な装置

- ・トランスファーメンブレン Immobilon®-FL にプロットし、抗体でプローブしたタンパク質
- ・Mylar® ラップ
- ・蛍光画像装置

下記は、蛍光免疫検出法に関する一般的なプロトコールです。最適な結果を得るには、試薬と共に提供されるメーカーのプロトコールを参照してください。注: 化学蛍光試薬を用いる場合には、試薬メーカーの指示書に従ってください。

1. プロットを希釈した蛍光色素標識二次抗体溶液内に配置し、穏やかに攪拌しながら1時間反応させます。
2. プロットを洗浄バッファーで3〜5回、各回5分間洗浄します。
3. プロットを清浄なフィルターペーパー上に配置して乾燥させます。
4. ラップフィルムを使用する場合には、Mylar製を使用します。Saran™ラップ (サランラップ) は、光を透過させ、蛍光を消してしまうため、使用しないようにします。
5. 適当な蛍光スキャナーを用いて、プロットを画像化します。

4.4 酵素結合免疫吸着検査法 (ELISA)

サンドイッチELISA

1. アッセイの前に、両方の抗体調製物を精製し、片方を標識しなければなりません。
2. ほとんどのアプリケーションに際しては、ポリ塩化ビニル (PVC) マイクロタイタープレートが最適ですが、タンパク質結合に最適なプレートの種類の決定にあたっては、製造業者のガイドラインを参照してください。
3. 約50 μL の抗体溶液を各ウェルに加え (PBS中で20 $\mu\text{g/mL}$)、非標識の抗体を各ウェルの底に結合させます。PVCは、約100 ng/ウェル (300 ng/ cm^2) で抗体と結合します。使用する抗体の量はアッセイによって異なりますが、最大の結合が必要であれば、少なくとも1 μg /ウェルは使用しましょう。この量は、ウェルの保持力をはるかに超えた量ですが、より迅速に結合が生じます。結合溶液は、保管して再使用することができます。
4. プレートを4°C、オーバーナイトでインキュベーションし、完全に結合させます。
5. ウェルをPBSで2回洗浄します。これには、500 mL容量のスプレーボトルが便利です。抗体溶液の洗浄液は、プレートを適切な容器の上で軽く振って除去することができます。
6. マイクロタイタープレートに残ったタンパク質結合部位は、ブロッキングバッファーとインキュベーションし、飽和しなければなりません。0.02%アジ化ナトリウムを含有する3%BSA/PBSをウェルの上部まで満たします。室温の湿った空気中で、2時間からオーバーナイトでインキュベーションします。
注：アジ化ナトリウムは、ホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) の阻害剤です。HRP標識抗体を検出に用いる場合は、アジ化ナトリウムをバッファーや洗浄溶液に入れないようにしましょう。
7. ウェルをPBSで2回洗浄します。
8. 50 μL の抗原溶液をウェルに加えます (抗原溶液は用量設定する必要があります)。すべての希釈には、ブロッキングバッファー (3% BSA/PBS) を用います。室温の湿った空気中で、2時間以上インキュベーションします。
9. プレートをPBSで4回洗浄します。
10. 標識した二次抗体を加えます。二次抗体の量は、予備実験によって決定することができます。正確に定量するためには、過剰量の二次抗体を使用します。すべての希釈には、ブロッキングバッファーを用います。
11. 室温加湿条件下で、2時間以上インキュベーションします。
12. PBSで、数回洗浄します。
13. 基質を、メーカーの指示に従い添加します。推奨されているインキュベーション時間が経過した後、目的の波長で化学発光または吸光度を、ELISAプレートリーダーを用いて測定します。

注：一部の酵素基質は発がん性が示唆されるため、有害物質とみなされています。注意して取扱い、適切な取扱いに関する注意については化学物質等安全データシートをご覧ください。

定量の結果については、未知のサンプルのシグナルを、標準曲線と比較します。正確性を保証するため、各アッセイで標準物質の実験を実施しなければなりません。

競合ELISA

1. ほとんどのアプリケーションに際しては、ポリ塩化ビニル (PVC) マイクロタイタープレートが最適な選択肢となりますが、タンパク質結合に最適なプレートの種類の決定にあたっては、製造業者のガイドラインを参照してください。
2. 50 μL の希釈した一次抗体 (捕捉抗体) を、各ウェルに加えます。サンプルの試験前に、チェッカーボード力価設定によって、適切な希釈率を決定します。PVCは、約100 ng/ウェル (300 ng/ cm^2) で抗体と結合します。使用する抗体の量はアッセイによって異なりますが、最大の結合が必要であれば、少なくとも1 μg /ウェルは使用しましょう。この量は、ウェルの保持力をはるかに超えた量ですが、より迅速に結合が生じます。結合溶液は、保管して再使用することができます。室温では4時間、4°Cではオーバーナイトでインキュベーションします。
注：精製済みの一次抗体が入手できない場合は、以下の手順に従い、最初にプレートを、一次抗体の免疫動物に対する精製済みの二次抗体を用いてコーティングします：
A. 約50 μL の抗体溶液を各ウェルに加え (PBS中で20 $\mu\text{g/mL}$)、非標識の二次抗体を各ウェルの底に結合させます。
B. プレートを4°C、オーバーナイトでインキュベーションし、完全に結合させます。
C. 一次抗体を加えます (上記と同じ)。
3. ウェルをPBSで2回洗浄します。これには、500 mL容量のスプレーボトルが便利です。抗体溶液の洗浄液は、プレートを適切な容器の上で軽く振って除去することができます。
4. マイクロタイタープレートに残ったタンパク質結合部位は、ブロッキングバッファーとインキュベーションし、飽和しなければなりません。0.02%アジ化ナトリウムを含有する3%BSA/PBSをウェルの上部まで満たします。室温加湿条件下で、2時間からオーバーナイトでインキュベーションします。
5. ウェルをPBSで2回洗浄します。
6. 50 μL の標準溶液またはサンプル溶液をウェルに加えます。すべての希釈には、ブロッキングバッファー (0.05% Tween®-20, 3% BSA/PBS) を用います。
注：アジ化ナトリウムは、ホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) の阻害剤です。HRP標識抗体を検出に用いる場合は、アジ化ナトリウムをバッファーや洗浄溶液に入れないようにしましょう。

7. 50 μ Lの標識抗原溶液をウェルに加えます(抗原溶液は用量設定する必要があります)。すべての希釈には、ブロッキングバッファー(0.05% Tween®-20, 3% BSA / PBS)を用います。室温の湿った空気中で、2時間以上インキュベーションします。
8. プレートにPBSで4回洗浄します。
9. 基質をメーカーの指示に従い添加します。推奨されているインキュベーション時間が経過した後、目的の波

長で化学発光または吸光度を、ELISAリーダーを用いて測定します。

注: 競合法では、反比例曲線が得られます。サンプルまたは標準溶液中の抗原の量が多いほど、色の変化が小さくなります。

4.5 マルチプレックスビーズベース検出

MILLIPLEX® MAP パネルには、標準プロトコルが添付されています。このパネルは、事前に標識された分析的に検証済みのパネルで、微量なサンプル容量(5~50 μ L)から複数の分析対象を検出するために必要な品質コントロールや、試薬、その他すべての構成部品が、1つのキットになっており、固有のカタログ番号を持ちます。

1. 細胞や組織の溶解液の調製については、標準的なプロトコルに従ってください。使用直前に、プロテアーゼ阻害剤(カタログ番号535140)、およびホスファターゼ阻害剤(カタログ番号524629)を添加することをお勧めします。
2. 事前精製した溶解液を、アッセイバッファーを用い、少なくとも1:1の割合で希釈します。アッセイに推奨されるタンパク質濃度の作用範囲は、各ウェルにつきトータルタンパク質2.5~15 μ gです(100~600 μ g/mLで25 μ L/ウェル)。調製した溶解液のコントロールについては、さらに希釈する必要はありません。
3. 96ウェルプレートを、200 μ Lのアッセイバッファーでブロッキングします。プレートをシールし、プレートシェーカーに載せ、室温(20~25°C)で10分間混合します。
4. 減圧吸引し、プレートをデカントします。
5. 25 μ Lの標準溶液、コントロール、サンプルを、マッピングしたウェルに加えます。
6. ビーズボトルをボルテックスし、25 μ Lのプレミックスビーズを各ウェルに加えます(注: ビーズを加える間は、沈殿しないように断続的にビーズボトルを振りまします)(捕捉抗体)。
7. プレートシェーカーで、室温(20~25°C)で2時間、または4°C、オーバーナイトでインキュベーションします。
8. 2~3回洗浄し、減圧吸引または吸引除去します。
9. 50 μ Lの検出抗体カクテルを加えます。
10. インキュベーション後、50 μ LのSA-PEを加えます。
11. 2~3回洗浄し、減圧吸引します。
12. 100 μ Lのシース液(MAGPIX®装置を用いる場合はドライブ液)を、すべてのウェルに加えます。プレートシェーカーで、ビーズを5分間再懸濁します。
13. Luminex™装置でデータを取得します。
14. 蛍光強度の中央値(MFI)のデータを保存・解析します(注: 比較するすべての溶解サンプルの希釈係数が同一であることを確認しましょう)。

💡 テクニカルヒント

- 保存したサンプルを用いる場合は、-20°Cの“霜取り機能付きの”冷凍庫で保管し、複数回(2回以上)の凍結・融解を避けましょう。
- 使用前に、冷凍したサンプルを完全に融解し、ボルテックスしてよく混合し、遠心分離します。
- サンプルは、ポリプロピレンチューブで保管します。サンプルをガラスチューブで保管してはいけません。
- プロテアーゼ阻害剤を溶解バッファーに加え、ホスファターゼを阻害するため、 Na_3VO_4 も加えます。
- 血液サンプルの場合は、遠心分離の前に血液を30分以上凝固させます。血清を除去し、直ちに試験するか、分注します。ヘパリンが過剰であると偽高値が生じるため、ヘパリンを抗凝固剤として使用する場合は注意が必要です。採取した血液1 mLにつき、ヘパリンが10 IUを越えてはいけません。

👍 注意

Tipsや代替プロトコル、様々なサンプルタイプの対処法については、下記リンク先をご参照ください。
<http://www.sigma-aldrich.com/milliplex-jp>

4.6 免疫組織化学／免疫細胞化学

新鮮な凍結（その後固定）組織切片

1. 小さな組織ブロック（5×5×3 mm程度）を、液体窒素で急速に凍結します。
2. クライオスタットに移し、薄い（5～30 μm）切片に切断します。
3. 標本を、ポリ-L-リジンでコーティングされた清潔なガラススライドの上に集めて載せ、室温でオーバーナイト乾燥させます（同日に染色したい場合は、完全に乾燥するまで1～2時間風乾します）。スライドにしっかり接着させるためには、完全に乾燥させることが重要です。
4. 切片を、アセトンか無水エタノールを用い、4°Cで15分間固定します。最良の結果を得るため、スライド10～15枚ごとにエタノールまたはアセトンを交換します。有機溶剤は、空気や組織中の水分を吸収し、それに伴い組織を効果的に固定する能力が失われます。
5. 室温または低温加熱（30～37°C）で、完全に風乾します。この段階で、ほとんどの化学固定が完了します。風乾が不適切であると、「軟らかな」切片になり、適切な反応性が失われる可能性が高くなります。
6. 免疫染色法を進めるか、凍結します。

固定した凍結組織切片

1. 一定時間、固定液を還流するか、固定液に浸漬することによって、組織を固定します。最も一般的には、4%パラホルムアルデヒド（PFA）溶液が用いられます。
2. 固定した組織は、水分安定化溶液に浸し、凍結保護の準備を行います。標的組織が安定化溶液中で浮かばなくなった時点で、凍結保護が完了しています。PBS＋ショ糖溶液は、作用が良好で比較的安価であることから、10%（低度の保護）から30%（w/v）ショ糖（高度な保護）の範囲でよく用いられています。
3. 安定化した後、組織を保護溶液から取り出し、切片化まで－70°Cで凍結します。
4. クライオスタットによって切片化（5～40 μm*）した場合は、切片をスライドに直接載せるか、PBS／水浴でスライド上に浮かべます。通常は、各スライドにつき最大3枚の切片を載せることができます。それぞれの切片の間には十分な間隔をあげます。間隔をあげることによって、サンプル間で試薬が混ざらないようにします。
*研究者の技術や、組織の種類によって、切片の厚さが異なります。切片が10～15 μmであると、明瞭性や完全性に関して最良の結果を得ることができます。6～9 μmの切片は、切断中に裂けてしまうことが多く、縁が粗くなり、バックグラウンドが増加する恐れがあります。分厚い切片は、取扱い中の強度は高いものの、染色が困難である場合があります。
5. スライド上の切片を、スライドウォーマーで、通常はオーバーナイト、または40～50°Cで2～3時間以上、完全に加熱／風乾させます。
6. 調製したスライドは、染色まで、－70°Cで乾燥したまま保存することができます。再水和や染色の前に、室温に平衡化し、短時間再乾燥させます。

パラフィン包埋切片

1. 通常の脱パラフィン・脱水手順：
 - A. 切片をキシレンでインキュベーションします：2～3回交換、各5分間。
 - B. 100% 無水エタノール：2回交換、各3分。
 - C. 95% エタノール：2回交換、各3分。
 - D. 80% エタノール：3分。
 - E. 50% エタノール：3分。
 - F. 純水、PBS、またはTrisバッファーですすぎます：2回交換、各3分。

注：切片を再水和した後は、乾燥させてはいけません。
2. スライドを、事前に加熱（37°C）した0.1%トリプシンを含有するPBSに5～60分間、または0.4% ペプシンを含有する0.01N HClに30分～1時間入れます。その後、純水ですすぎます。
3. ペルオキシダーゼ標識体を使用する場合は、この段階で内因性のペルオキシダーゼのブロッキングを行います。ペルオキシダーゼ活性によって、過酸化水素（H₂O₂）の分解が生じます。これは、ヘモグロビン、ミオグロビン、チトクローム、カタラーゼなどのすべてのヘムタンパク質に共通する特性です。ホルマリン固定した組織中の内因性ペルオキシダーゼ活性の抑制には、切片を3% H₂O₂で8～10分間インキュベーションします。20分間のメタノールH₂O₂処理（3% H₂O₂：無水エタノール＝1：4）を用いることもできますが、細胞表面マーカーを染色する標本には推奨されません。また、メタノール処理によって、凍結切片がキャリアガラスから剥がれてしまう可能性もあります。
4. PBSで2回洗浄します。
5. 免疫染色手順に進みます。

ウサギポリクローナルまたはマウスモノクローナル一次抗体を用いた染色

以下の一般的なプロトコールは、それぞれの抗体に特異的な手順を開発するためのガイドラインとして使用してください。抗体や組織によって、この手順を変更する必要があるかもしれません。個々の製品のデータシートや、関連する文献の調査は、特定のアプリケーションに向けた手順のカスタマイズに有用となる場合があります。

1. 洗浄ボトルを用いて、切片が接着しているスライドを、純水かバッファーで穏やかにすすぎます。スライドを室温のバッファーに5分間入れ、切片を再水和します。
2. キムワイプ®を用い、標本の周りの余分な液体を拭き取ります。組織に直接触れないように注意しましょう。
3. 1：5～1：30（最終濃度3%～20%）に希釈した正常血清（二次抗体の免疫動物の正常血清）を、4～6滴加えます。37°Cで20～30分間インキュベーションします。

- 血清を軽く振るい落とし、余分を拭き取ります。すすいではいけません。
- 必要に応じて、抗原賦活化を実施します。
- 適切に希釈したウサギ(マウス)一次抗体を、各組織切片につき25～50 μL 加えます。切片が抗体で完全に覆われるようにします。適切な時間インキュベーションします(推奨されるパラメータや温度については、第3.7章の抗体染色を参照してください)。至適な抗体の希釈率が不明である場合には、1:20～1:1,000の範囲で抗体の希釈系列を試験します。

注:再現性のある反応性を得るためには、抗体の希釈液が非常に重要となることがよくあります。単純な溶液は、複雑なものよりもトラブルシューティングが容易です。このため、通常は、単純なバッファー(PBSまたはTBS)を用いて抗体を希釈するようお勧めします。

- 洗浄ボトルを用いて、スライドを純水かバッファーで穏やかにすすぎ、バッファーで5分間インキュベーションします。これを3回繰り返します(洗浄の度にバッファーを交換します)。

注:すべての手順において、各ステップでバッファーが適切に用いられており、各ステップ後には、反応しなかった溶液が洗い流されていることを確認することが重要です。

- 適切に希釈した、ウサギ(マウス)免疫グロブリンを標的とする酵素標識抗体を、25～50 μL 加えます。45～60分間インキュベーションします。
- 洗浄ボトルを用いて、スライドを純水かバッファーで穏やかにすすぎ、バッファーで5分間インキュベーションします。これを3回繰り返します(洗浄の度にバッファーを交換します)。
- 基質 - 色素原溶液を加え、望ましい色彩強度が現れるまでインキュベーションします。
- 洗浄ボトルを用い、純水で穏やかにすすぎます。対比染色し、カバーガラスを載せます。

4.7 フローサイトメトリー

フローサイトメトリーのための直接染色プロトコール

注:以下のプロトコールは、各実験アッセイに特異的なプロトコールを構築する際に、テンプレートとして使用可能な一般的な手順です。個々の実験系に適切な手順の開発にあたっては、フローサイトメトリー施設や技術者と協力することを強くお勧めします。

必要品:

- 1% BSAまたは2% FCS PBSで調製・カウントした細胞(約 $0.5 \sim 1 \times 10^6/\text{mL}$)
- 望ましい細胞表面マーカーに対する直接標識モノクローナル抗体
- 洗浄バッファー(1×DulbeccoのPBS、 Ca^{2+} および Mg^{2+} を含まないもの、1% BSAの有無別)
- 任意の固定液:1%ホルムアルデヒド／PBS、pH 7.4、新鮮に調製したもの

方法:

- 50～100 μL の細胞懸濁液を、3本の12 × 75 mmのポリプロピレンまたはポリスチレンチューブにそれぞれ加えます。

注:回収した細胞の初期量は、50 μL を加えたときに約 10^5 細胞/チューブになるように、約 0.75×10^6 細胞/mLに調節する必要があります。

- 最初のチューブには、適切な量(通常5～10 μL)の蛍光色素標識モノクローナル抗体を加えます。次のチューブには、同量の対応するアイソタイプコントロール抗体を加えます。アイソタイプコントロール抗体は、対象となる標識抗体のアイソタイプに一致している必要が

あります。最後のチューブの細胞には、標識抗体の代わりに、同量の1×PBSを加えます。これは、フローサイトメーターの適切な蛍光補正を確立するための自家蛍光コントロールとなります。各サンプルチューブを、適度な速度でボルテックスします。

- サンプルを、室温または4°Cで、暗所で20～30分間インキュベーションします。
- チューブ内の細胞を、3 mLの1% BSA 1×PBSで洗浄し、サンプルを、400 × g、室温で10分間遠心分離します。上清を慎重にデカントするか、ピペットで除去します。必要に応じて、このステップを繰り返してもかまいません。
- 直ちに使用する場合は、細胞を固定せずに解析することができます。細胞ペレットを500 μL のPBS洗浄溶液に再懸濁し、使用まで4°Cの暗所で保管します(通常4時間以内)。または、細胞ペレットを、残った洗浄バッファーでボルテックスして緩めます。500 μL の1%ホルムアルデヒド／PBSを各サンプルに加え、再度素早く混合します。固定液を加える前に、必ず細胞ペレットを混合しなければなりません。混合しないと、細胞が塊として固定されてしまい流路を目詰まりさせる可能性を生じます。固定したサンプルは、フローサイトメトリー解析の実施まで、4°Cの暗所で保存することができます。固定したサンプルは、48時間以内に使用しましょう。

4.8 機能的阻害および刺激アッセイ

タンパク質の構造と機能の関連性はとても複雑であるため、機能的抗体アッセイの基本的なプロトコルを一般化することは非常に困難です。

細胞溶解液または組換えタンパク質をベースとした中和試験では、およその目安として、 ND_{50} (50%中和用量) を達成するため、標的タンパク質の濃度の 10^3 倍の中和抗体を使用します。 ND_{50} 曲線の判定には、抗体を段階希釈する必要があります。

通常は、最初に抗体と抗原を懸濁液中で結合させます。その後、段階希釈した抗体を、細胞株または酵素基質に加え、その用量における作用を測定します。

化合物の生理活性の測定を目的とした一般的な抗体中和プロトコル

サイトカインのバイオアッセイに使用されたこの特徴的な中和抗体プロトコルは、以下から転用したものです：G.M.Veldman *et al.* in R. Kontermann & S. Dübel (eds.), *Antibody Engineering* Vol. 1. 別の機能的阻害プロトコルや設計の考慮点に関する詳細については、上記を参照してください。優れた考察や、機能的阻害抗体に関するガイドなどが提供されています。

抗体の中和能の測定を目的とした一般的なバイオアッセイ

(IL-18に対するKG-1アッセイ) (Konishi *et al.* 1997; Fernandez-Botran & Větvička 2001)

バイオアッセイの準備の最初のステップは、多様な濃度のヒトIL-18に対するKG-1細胞株の生物学的反応を測定することです。その後アッセイの第2部で使用する抗ヒトIL-18抗体濃度を選択します。中和抗体の効力は、 IC_{50} として表されます。 IC_{50} は、IL-18によって誘発されたIFN γ 応答を50%阻害する抗体濃度です。

A. IL-18に対する生物学的反応曲線の判定

1. IL-18の標準曲線を作製します。96ウェル希釈プレートを用い、完全培地で、ヒトIL-18 (2,000 ng/mLで開始) の1:2 (16段階) または1:4 (8段階) の段階希釈を調製します。
2. 96ウェル平底組織培養プレートに、100 μ L/ウェルのヒトIL-18の希釈液を、4組ずつ加えます。IL-18を含有しない完全培地を100 μ L/ウェル入れた8個のコントロールウェルも設けます。
3. KG-1細胞を回収し、1,500 rpmで5分間遠心分離し、培地を吸引除去した後、細胞を、20 ng/mLのヒトTNFを含む完全培地に、 3×10^6 細胞/mLの細胞密度で再懸濁します。
4. 100 μ LのKG-1細胞を96ウェルプレートの各ウェルに加え、37°C、5% CO_2 で24時間インキュベーションします。
5. セクションCに進みます。

B. 抗体中和反応

1. 96ウェル希釈プレートを用い、完全培地で、IL-18抗体の1:2 (16点) または1:4 (8点) の段階希釈を調製します (300 nMで開始)。
2. 96ウェル平底組織培養プレートに、50 μ L/ウェルの希釈したIL-18抗体を4組ずつ加えます。IL-18抗体を含有しない完全培地を50 μ L/ウェル入れた8個のコントロールウェル (IL-18のみのコントロールウェル) と、IL-18抗体を含有しない完全培地を100 μ L/ウェル入れた8個のコントロールウェル (培地のみのコントロールウェル) も設けます。
3. 培地のみのコントロールウェル以外のウェルに、50 μ L/ウェルのヒトIL-18 (8 ng/mL) を加えます。IL-18とIL-18抗体を含有するプレートを、37°C、5% CO_2 で1時間プレインキュベーションします。
4. KG-1細胞を回収し、1,500 rpmで5分間遠心分離し、培地を吸引除去した後、細胞を、20 ng/mLのヒトTNFを含有する完全培地に、 3×10^6 細胞/mLの細胞密度で再懸濁します。
5. 100 μ LのKG-1細胞を96ウェルプレートの各ウェルに加え、37°C、5% CO_2 で24時間インキュベーションします。
6. セクションCに進みます。

C. IL-18の生物活性および抗体中和反応の測定

1. プレートの内容物を96ウェルV底組織培養プレートに移し、プレートを1,500 rpmで10分間遠心します。150 μ Lの培養上清を、96ウェル平底組織培養プレートに移します。細胞ペレットを壊さないように注意しましょう。この段階で、上清を-20°Cで保存することもできます。
2. ヒトIFN γ ELISAキットを用い、上清中のヒトIFN γ 濃度を測定します。データポイントが、ELISAの標準曲線の範囲内にあたるように、上清をさらに希釈する必要があるかもしれません。
3. Y軸にヒトIFN γ 、X軸にIL-18濃度をプロットし、IL-18の EC_{50} または EC_{70} を算出します。
4. Y軸にヒトIFN γ 、X軸に抗体濃度をプロットし、IL-18抗体の IC_{50} を算出します。最大のIFN γ 応答は、IL-18のみのコントロールウェルから、バックグラウンドのIFN γ 応答は、培地のみのコントロールウェルから判定することができます。抗体の IC_{50} は、バックグラウンド応答を差し引いた最大IFN γ 応答を50% 阻害する濃度です。

Lined area for writing notes, consisting of multiple horizontal lines.

付録

抗体の段階希釈の作成

試薬／機器：

- PBSまたはその他の適切なバッファー
- 小型のキャップ付きチューブ
- 200 μ Lおよび1,000 μ Lの容量を正確に測定可能なピペット

バッファーやチューブは、氷上に置いておきます。

1. ピペットを用い、450 μ Lのバッファーをチューブに入れ、チューブXとします。
2. 50 μ Lの抗体溶液を入れ、混合します。これによって、チューブXの抗体は1:10希釈となります。
3. 1:50、1:100、1:200、1:400などから1:204,800希釈まで、チューブにAからMのラベルを付けます。
4. ピペットを用い、1,600 μ Lの希釈用緩衝液をチューブAに入れます(1:50希釈用)。ピペットを用い、1,000 μ L (1.0 mL)の希釈用緩衝液を、チューブBからMに入れます(1:100～1:102,400希釈用)。
5. ピペットを用い、チューブXから400 μ Lの1:10抗体希釈液を、チューブA(バッファーが1,600 μ L入っているもの)に入れます。よく混合します。これによって、1:50抗体希釈液ができます。
6. チューブAから1,000 μ Lの抗体サンプルを採取し、チューブB(バッファーが1,000 μ L入っているもの)に入れます。よく混合します。
7. チューブBから1,000 μ Lの抗体サンプルを採取し、チューブC(バッファーが1,000 μ L入っているもの)に入れます。よく混合します。

チューブ	希釈するサンプル	サンプル容量	バッファー容量	希釈率
A	1:10	400 μ L	1,600 μ L	1:50
B	1:50	1,000 μ L	1,000 μ L	1:100
C	1:100	1,000 μ L	1,000 μ L	1:200
D	1:200	1,000 μ L	1,000 μ L	1:400
E	1:400	1,000 μ L	1,000 μ L	1:800
F	1:800	1,000 μ L	1,000 μ L	1:1,600
G	1:1,600	1,000 μ L	1,000 μ L	1:3,200
H	1:3,200	1,000 μ L	1,000 μ L	1:6,400
I	1:6,400	1,000 μ L	1,000 μ L	1:12,800
J	1:12,800	1,000 μ L	1,000 μ L	1:25,600
K	1:25,600	1,000 μ L	1,000 μ L	1:51,200
L	1:51,200	1,000 μ L	1,000 μ L	1:102,400
M	1:102,400	1,000 μ L	1,000 μ L	1:204,800

プロテインA／Gの結合親和性

種	免疫グロブリン	プロテインA	プロテインG
ウシ	Ig	++	++++
ニワトリ	Ig	-	+
ヤギ	Ig	+/-	++
モルモット	Ig	++++	++
ハムスター	Ig	+	++
マウス	IgG ₁	+	++
	IgG _{2a}	++++	++++
	IgG _{2b}	+++	+++
	IgG ₃	++	+++
	IgM	+/-	-
ブタ	Ig	+++	+++
ウサギ	Ig	++++	+++
ラット	IgG ₁	-	+
	IgG _{2a}	-	++++
	IgG _{2b}	-	++
	IgG _{2c}	+	++
	IgM	+/-	-
ヒツジ	Ig	+/-	++

凡例： - (なし)、+/- (非常に低い)、+ (低い)、---> ++++ (高い)

ウェスタンブロット法および免疫沈降法に有用な調製品

細胞溶解バッファー

50 mM Tris-HCl, pH8.0
150 mM NaCl
1% NP-40 または Triton® X-100

2x 免疫沈降バッファー

2% Triton® X-100
300 mM NaCl
20 mM Tris, pH 7.4
1% NP-40
2 mM EDTA
2 mM EGTA
0.4 mM バナジン酸ナトリウム (ホスファターゼ阻害剤)
0.4 mM PMSF

2x SDS-PAGE サンプルバッファー

100 mM Tris-HCl, pH 6.8
2% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)
20% グリセリン
0.2% ブロムフェノールブルー
2～10% β -メルカプトエタノール (またはDTT)

100×プロテアーゼ阻害剤カクテル

PMSF 5 mg (50 μ g/mL)
アプロチニン100 μ g (1.0 μ g/mL)
ロイペプチン100 μ g (1.0 μ g/mL)
ペプスタチン100 μ g (1.0 μ g/mL)
100%エタノールを加えて1 mLにします。分注し、-20℃で保存します。

推奨されるアクリルアミドゲルの割合

% アクリルアミド	タンパク質のサイズ幅
8%	40–200 kDa
10%	21–100 kDa
12%	10–40 kDa

一般的な固定液の調製方法

注意：ホルムアルデヒドは有毒であるため、ドラフトチャンバー内で慎重に取り扱う必要があります。すべての実験用化学物質の適切な取扱いについては、化学物質等安全データシートをご覧ください。

4% パラホルムアルデヒド (PFA)

1. 250 mLの2×リン酸バッファーストック溶液（ステップ4参照）を、フード内で、ディスポーザブルスターラーを入れたビーカーで60°Cまで加熱します。
2. 20 mgの顆粒状パラホルムアルデヒドを加え、溶解するまで攪拌します。
3. 250 mLの脱イオン水を加え、溶液を氷上に置いた容器にろ過します。溶液が冷えたら準備完了です。pHを7.0～7.4に調整します。
4. 2×リン酸バッファーストック溶液は、7.7 gのNaOHと33.6 gの $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ を1 Lの脱イオン水に溶解して調製します。

2%グルタルアルデヒドを含有する4%パラホルムアルデヒド

1. 250 mLの2×リン酸バッファーストック溶液（上記参照）を、ディスポーザブルスターラーを入れたビーカーで60°Cまで加熱します。
2. 20 mgの顆粒状パラホルムアルデヒドと10 gのグルタルアルデヒドを加え、溶解するまで攪拌します。
3. 250 mLの脱イオン水を加え、溶液を氷上に置いた容器にろ過します。溶液が冷えたら準備完了です。pHを7.0～7.4に調整します。

緩衝ホルムアルデヒド液（ホルマリリン）

1. 32.5 gの $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ と20 gの $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ を4.5 Lの脱イオン水に溶解します。
2. 500 mLの40%ホルムアルデヒドを加えます。
3. 混合し、pHを7.0～7.4に調整します。

ブアン液

1. ピクリン酸（標準水溶液）75 mL
2. ホルマリリン（40% 水性ホルムアルデヒド）20 mL
3. 氷酢酸5 mL
4. 混合します。

カルノア固定液

1. 氷酢酸10 mL
2. クロロホルム30 mL
3. 無水エタノール（100% エタノール）60 mL
4. 混合します。

PLP（過ヨウ素酸-リジン-パラホルムアルデヒド）固定液

1. 7.3 gのリジン塩酸塩を、200 mLの再蒸留水に溶解します。
2. 0.1 M Na_2HPO_4 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 17.8 g/L) を用いて、pHを7.4に調整します。リン酸バッファーストック溶液を用いてはいけません！
3. pH 7.4の0.1 Mリン酸バッファーストック溶液を用い、容量を400 mLに定容します。このリジンリン酸バッファーストック溶液は、冷蔵庫で2～3日保存可能ですが、分注して凍結すると長期間保存することができます。
4. 使用の直前に、375 mLのリジンリン酸バッファーストック溶液を、100 mLの20%ホルムアルデヒドと混合し、再蒸留水で500 mLに定容します。1.06 gの過ヨウ素酸ナトリウム (NaIO_4) を加え、よく混合します。PLP固定液は、最長でも2時間以内に使用しなければなりません。
最終濃度：リジン75 mM、ホルムアルデヒド4%、過ヨウ素酸ナトリウム10 mM。
（注：文献の一部のPLP調製品では、2%パラホルムアルデヒドも使用しています）

アセトン／メタノール固定液

1. アセトン100 mL
2. 100 mLのメタノールを加えます。
3. よく混合します。新鮮なうちに使用します。50-50溶液は、室温または-20°Cで使用します。

用語集

アジュバント (Adjuvant) - 抗原に対する免疫応答を増強する能力を有するすべての物質。

親和性 (Affinity) - 単一の抗原部位における抗体と抗原の間の反応の強度。

アフィニティー精製 (Affinity purification) - 特異的な抗体の分画が、その対象である抗原に結合することを利用したカラム精製。

親和定数 (Affinity constant) - 抗体と抗原の結合相互作用を表す定数。結合または平衡定数。

アレルゲン (Allergen) - 過敏症またはアレルギー反応を誘発する抗原。

抗体 (Antibody) - 抗原に感受性のある動物において、抗原と特異的に結合することが可能な免疫グロブリン。

抗原 (Antigen) - 特異的な免疫応答を誘発する異物。

抗原抗体複合体 (Antigen-Antibody complex) - 抗体と抗原分子の非共有結合体 (免疫複合体)。

抗原賦活化 (Antigen retrieval) - 組織中の抗原に対する抗体の結合を増強するために設計された手順で、通常はエピトープ - ブロッキング固定または包埋技術に対する処理。

抗血清 (Antiserum) - 対象の抗体ならびにその他の血清タンパク質を含有すると考えられる免疫動物から採取した血液。

腹水 (Ascites fluid) - 生存する免疫動物内で増殖させたハイブリドーマから直接採取した、未精製のモノクローナル抗体を含有する組織液。

結合活性 (Avidity) - 全抗原抗体複合体の全体的な結合強度の尺度。

B細胞 (B cells) - 抗原による活性化後に、抗体産生細胞に分化するBリンパ球。

捕捉抗体 (Capture antibody) - 溶液中の抗原に結合させるため、ELISAにおいて使用される固定した一次抗体。

キャリアタンパク質 (Carrier protein) - 免疫化した動物において、より多大な特定の免疫応答をより素早く誘発するために、小型の抗原やハプテンと組み合わせて用いられる抗原性の高いタンパク質。

化学発光 (Chemiluminescent) - 酵素によって触媒される化学反応を通した光の産生；化学発光基質は、検出にX線フィルムかその他の光捕捉装置が必要。

色素原 (Chromogen) - 特定の酵素 (で標識した抗体) の存在によって色を変える化学基質。例：DAB。

補体 (Complement) - 血漿タンパク質のグループで、細胞外の病原体を攻撃するための一連の反応を担う。

立体構造エピトープ (Conformational epitope) - タンパク質が折り畳まれることによって、タンパク質の一次配列のいくつかの別々の領域が接近して形成されるエピトープ。

交差反応性 (Cross-reactivity) - 抗体または抗体の集団が、免疫応答を誘発した抗原以外のエピトープに結合すること。

変性 (Denatured) - エピトープを露出または破壊する可能性がある抗原の立体構造変化。

検出抗体 (Detection antibody) - 抗原の二次抗体標識のため、ELISAにおいて使用される一次抗体。

ELISA (酵素結合免疫吸着検査法) (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) - 未知のサンプル中の抗原または抗体を捕捉・定量するために抗体または抗原を用いる血清学的技術。

エピトープ (Epitope) - 相補的な抗体がその可変領域を介して結合する抗原の小さな部位。

フローサイトメトリー (Flow cytometry) - 通常は蛍光抗体を用いて懸濁液中の細胞全体を標識し、細胞が光源を通過する際に測定・選別を行う技術。

蛍光色素 (蛍光プローブ) (Fluorochrome (fluorophore)) - 特定のレーザーまたは化学相互作用に応じて明確かつ測定可能な色スペクトルを発する抗体の標識分子。

ハプテン (Hapten) - より大きなキャリアタンパク質と化学的に結合せずには特異的な抗体反応を誘発することができない小分子。

ヒンジ領域 (Hinge region) - FabアームをFc領域に接合する抗体の可動部。

ハイブリドーマ (Hybridoma) - 特定のモノクローナル抗体を産生するハイブリッド細胞株。特定の抗体を産生するBリンパ球を、自身の免疫グロブリン鎖を産生せずに組織培養中で増殖する骨髓腫細胞と融合することによって形成される。

ハイブリドーマ上清 (Hybridoma supernatant) - ハイブリドーマ細胞培養液から調製されるモノクローナル抗体を含有する液。

免疫 (Immunity) - 非自己による感染に抵抗する能力。

免疫ブロット法 (Immunoblotting) - 電気泳動ゲルからメンブレンにトランスファーされたタンパク質をプローブするために抗体を用いる技術。例：ウェスタンブロット。

免疫細胞化学 (Immunocytochemistry) - 生細胞または固定した培養細胞において、特定の抗原をプローブするために抗体を用いる技術。

免疫拡散法 (Immunodiffusion) - アガロースゲル内で沈降する抗原 - 抗体の形成によって、抗原または抗体を検出する技術。

免疫蛍光法 (Immunofluorescence) - 蛍光色素で標識した抗体を用い、抗原分子を検出する技術。

免疫原性 (Immunogenic) - 抗体産生を刺激する抗原の能力。

免疫グロブリン (Ig) (Immunoglobulin) - 抗体として機能する多数のクラスの抗体に対する一般的な名称。

免疫組織染色 (Immunohistochemistry) - 新鮮な凍結組織または処理した組織において、特定の抗原をプローブするために抗体を用いる技術。

免疫沈降法 (Immunoprecipitation) - 抗体を溶液中の抗原に結合させ、沈降する複合体を形成させる技術。

モノクローナル抗体 (Monoclonal antibody) - B細胞を不死化した培養細胞と融合して作成したクローン化されたハイブリドーマによって産生される均一な抗体の集団。

陰性コントロールサンプル (Negative control sample) - 過去の研究によって、対象の抗原を含有しないことが知られている組織、細胞株、細胞溶解液、または精製タンパク質。

中和 (Neutralization) - 抗体が病原体に結合し、その増殖および／または細胞への侵入を防止する機序。

正常血清 (Oposonization) - 免疫化されていない動物から採取した血清；陰性コントロールとして利用できる。

オプソニン化 (Oposonization) - 病原体の表面を何らかの分子でコーティングし、食細胞によって貪食されやすくすること。

至適機能希釈率 (Optional working dilution) - 陽性シグナルを最大化しながら、バックグラウンド (陰性) 反応を最小化する濃度 (希釈率)。

ペプチド (Peptide) - 配列特異的な抗体の産生に用いられる短いアミノ酸配列。

食細胞 (Phagocytes) - 好中球やマクロファージなど、貪食作用を行うために特殊化された細胞

形質細胞 (Plasma cells) - 抗体を産生する最終分化したB細胞。

ポリクローナル抗体 (Polyclonal antibody) - 抗原に対する複数のB細胞の反応により、産生される抗原の多様なエピトープを認識する抗体の混合物。

陽性コントロールサンプル (Positive control sample) - 過去の研究により、特定のアプリケーションにおいて、対象の抗原を含有し、結合することが知られている組織、細胞株、細胞溶解液、または精製タンパク質。

免疫前血清 (Pre-immune serum) - 抗原物質を用いた免疫化の前に動物から採取した血清；陰性コントロールとして利用できる。

一次抗体 (Primary antibody) - 対象の抗原に直接結合する抗体。

プロテインA (Protein A) - IgGのFc領域に結合する黄色ブドウ球菌の細胞膜成分の一種。

プロテインA/G精製 (Protein A/G purification) - 抗体のFc領域が、高親和性の黄色ブドウ球菌のプロテインAまたはGに結合することを利用したカラム精製。

二次抗体 (Secondary antibody) - 通常は、抗原に結合した一次抗体に結合する標識抗体。二次抗体は、一次抗体に結合したストレプトアビジンに結合する場合もある。

特異性 (Specificity) - 特定の抗体が、相補的な特定の抗原のエピトープに結合する可能性。

T細胞 (T cells) - 胸腺において生じるTリンパ球。

結合価 (Valency) - 抗体が抗原と相互作用する相対的な能力。通常は抗原に結合可能な可変領域の数。

ウェスタンブロット (Western blot) - 電気泳動によって分離し、メンブレンに結合させたタンパク質を、特異抗体を用いて検出する技術。

Lined area for writing notes, consisting of multiple horizontal lines.

特集

Monoclonal anti-flag M2 antibody

世界1位の抗体



Image by <https://www.citeab.com/>

SIGMA-ALDRICH®

論文引用に基づく抗体検索エンジン“CiteAb” (<https://www.citeab.com/>) にて2016年世界で最も引用された抗体としてthe CiteAb Antibody Awards “Most cited antibody of the year”部門でシグマ アルドリッチの**Monoclonal Anti-FLAG® M2**が選ばれました！

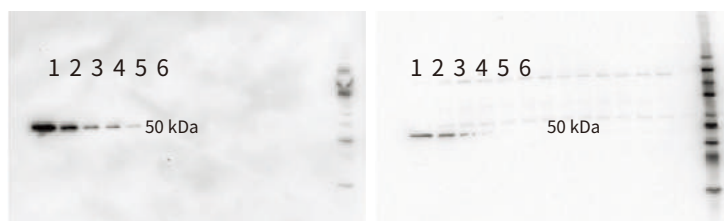
シグマ アルドリッチの抗体は2014年にCiteAbにて本賞が設立されて以来、さまざまな部門で続けて受賞しております。今後も品質の高い革新的な製品の供給に努めてまいります。引き続きご愛顧いただきますよう、何卒よろしくお願い申し上げます。

受賞
製品

世界1位の抗FLAG M2抗体

モノクローナル抗FLAG M2抗体 (カタログ番号 F1804)

従来のマウスモノクローナル抗FLAG M2抗体をアフィニティ精製して特異性をさらに高めた抗FLAG M2抗体です。



Sigma®の抗FLAG M2抗体 (左) と他社の抗DYKDDDDK抗体 (右) の比較

サンプル1から6の順に10 ng、5 ng、2.5 ng、1.25 ng、0.6 ng、0.3 ngのFLAG-BAPタンパク質を含むHeLa細胞抽出液をロードし、SDS-PAGEで分離後、ウェスタンブロットによりFLAG-BAPタンパク質を検出しました。

製品の特長

- 高い反応性と低いバックグラウンド
- 染色で特に高い評価
- 引用論文4,000以上

抗原：DYKDDDDK

反応性：FLAGタグ、3xFLAGタグ

アプリケーション：WB、免疫染色、免疫沈降

免疫動物：マウス (アイソタイプIgG1)

包装容量	カタログ番号	販売取扱
50 µg	F1804-50UG	Sigma-Aldrich
200 µg	F1804-200UG	Sigma-Aldrich
1 mg	F1804-1MG	Sigma-Aldrich
5 mg	F1804-5MG	Sigma-Aldrich

根強い
人気

強い反応性の抗FLAG M2抗体

モノクローナル抗FLAG M2抗体 (カタログ番号 F3165)

従来のマウスモノクローナル抗FLAG M2抗体です。マウス腹水から精製されたイムノグロブリンのため、アフィニティ精製抗体より強い反応性が期待できます。

抗原：DYKDDDDK

反応性：FLAGタグ、3xFLAGタグ

アプリケーション：WB、免疫沈降、免疫染色、ELISAなど

免疫動物：マウス (アイソタイプIgG₁)

包装容量	カタログ番号	販売取扱
0.2 mg	F3165-.2MG	Sigma-Aldrich
1 mg	F3165-1MG	Sigma-Aldrich
5 mg	F3165-5MG	Sigma-Aldrich

FLAG精製のベストセラー

抗FLAG M2抗体アフィニティゲル

レジン (アガロース) にマウスモノクローナル抗FLAG M2抗体を共有結合させた製品です。哺乳類細胞や大腸菌などで発現させたFLAGまたは3xFLAG融合タンパク質の精製に用いられます。

抗原：DYKDDDDK

交差性：FLAGタグ、3xFLAGタグ

適用：FLAGタグ融合タンパク質の精製

結合能：0.6 mg/mL

包装容量	カタログ番号	販売取扱
1 mL	A2220-1ML	Sigma-Aldrich
5 mL	A2220-5ML	Sigma-Aldrich
10 mL	A2220-10ML	Sigma-Aldrich
25 mL	A2220-25ML	Sigma-Aldrich

FLAGシステムの詳細はこちら

[Sigma.com/flag-jp](https://sigma.com/flag-jp)



販売取扱について：カタログ番号を黒で表記している製品の取扱いは**メルク株式会社**、赤で表記している製品の取扱いは**シグマ アルドリッチジャパン合同会社**となります。ご確認のうえ、各社へご注文くださいますようお願い申し上げます。

【製品の技術的なお問い合わせ (テクニカルサービス)】

<メルク製品>

TEL: 03-4531-1140

FAX: 03-5434-4859

Email: bioinfo@merckgroup.com

<シグマ アルドリッチ製品>

TEL: 03-6756-8245

FAX: 03-6756-8302

Email: sialjpts@sial.com



あなたの研究のためだけのオリジナル抗体を作りませんか？

シグマ アルドリッチのカスタム抗体作製受託サービス

ポリクローナル抗体作製

- ・抗原デザインから免疫、抗体精製まで、抗体作製をトータルサポート
- ・実験動物生産施設等福祉認証機関での免疫
- ※エンリッチメントオプションあり

5,000羽以上の実績

安心の国内免疫

抗原デザインに自信あり!!

SPFウサギ使用

ELISAによる抗体価保証

抗体取得率>99%

問い合わせ先が新しくなりました!

- 製品に関するお問い合わせ

TEL:03-6756-8260 FAX: 03-6756-8306

- ご注文方法に関するお問い合わせ

TEL:03-6756-8270 FAX: 03-6756-8306

Email: customjp.ts@sial.com

シグマ カスタム抗体 検索

モノクローナル抗体作製

- ・アプリケーションに応じて、ご満足いただける結果を保証する完全成功報酬制を採用
- ・陽性クローン樹立まで最短4日
- ・権利・ハイブリドーマを完全譲渡

完全成功報酬制



弊社製品を安心してお使いいただくための

テクニカルサポート連絡先

1営業日以内に回答 – 製品に関連する技術的な質問

現在、弊社テクニカルサービスは、弊社製品に関する技術的な疑問や質問に対し、1営業日以内にお客様へ回答することを目標にしております。ご検討段階で明らかにしておきたい製品性能や実験手法から、実験後のトラブルシューティングまで、お気軽にご相談ください。

速やかな不具合品交換 – 製品不具合の対応

弊社では、ご購入いただいた製品が規定の性能を満たさなかった場合、できる限り速やかに同一品あるいは代替品と交換させていただきます。製品の製造からお届けまでの各ステップで細心の注意を払っておりますが、万が一製品の不具合が発生した場合は、下記連絡先までお気軽にご連絡ください。

- シグマ アルドリッチ製品

TEL:03-6756-8245 FAX:03-6756-8302

Email: sialjpts@sial.com

- シグマ アルドリッチ カスタム製品

TEL:03-6756-8260 FAX:03-6756-8306

Email: customjp.ts@sial.com

- メルク製品

TEL:03-4531-1140 FAX:03-5434-4859

Email: bioinfo@merckgroup.com



メルクライフサイエンスの
最新情報をお届けします

Mail Magazine

メールマガジンご登録はこちらから

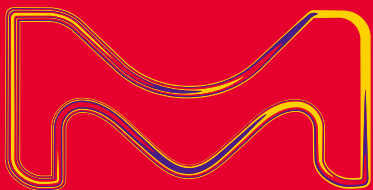
▶ www.merckmillipore.jp/wm

分野毎に5種類のメールマガジンを配信しております。

メルクとシグマ アルドリッチの製品情報を合わせて旬なニュースをお届けします。

Researchfocus (月1-4回) ライフサイエンス関連製品の情報はこちら

ライフサイエンス研究者に向け、基礎科学知識から最先端技術まで幅広い情報をお届けします。



本紙記載の製品は試験・研究用です。ヒト、動物への治療、もしくは診断目的として使用しないようご注意ください。本紙記載の製品構成は諸般の事情により予告なく変更となる場合がありますのでご了承ください。記載価格に消費税は含まれておりません。本文中のすべてのブランド名または製品名は特記なき場合、Merck KGaA の登録商標もしくは商標です。TWEEN is a registered trademark of Croda International PLC. 4G10 is a registered trademark of Dana-Farber Cancer Institute, Inc. Triton is a trademark of The Dow Chemical Company or an affiliated company of Dow. Mylar is a registered trademark of Dupont Teijin Films. Image Stream は富士フイルム株式会社の登録商標です。FLUORO-JADE is a registered trademark of Histo-Chem, Inc. キムワイプは Kimberly-Clark Worldwide, Inc. の登録商標です。Alexa Fluor and Texas Red are registered trademarks of Life Technologies. xMAP is a registered trademark of Luminex Corp. FLEXMAP 3D, MAGPIX and LUMINEX are registered trademarks of Luminex Corporation a company organized and existing under the laws of the State of Delaware. SYPRO is a registered trademark of Molecular Probes, Inc. 本紙記載の内容は 2017 年 11 月時点の情報です。© 2017 Merck KGaA, Darmstadt, Germany. All rights reserved.

メルク株式会社

ライフサイエンス リサーチ & バイオロジー

〒153-8927 東京都目黒区下目黒 1-8-1 アルコタワー 5F

製品の最新情報はこちら www.merckmillipore.jp/bio

お問合せ▶ E-mail: bioinfo@merckgroup.com Tel: 03-4531-1140 Fax: 03-5434-4859