

同一動物種抗体を用いた蛍光二重染色法

○安井正佐也^{A)}， 正岡実^{A)}， 高木佐知子^{A)}， 程 晶磊^{A)}

^{A)} 医学系技術支援室 生物・生体技術系

概要

免疫組織化学法は抗原-抗体反応という特異的な結合反応を利用し、目的とするタンパク質の細胞内および組織内の局在を検出する手法である。近年では特に蛍光抗体法を用いて、一つの標本で2種あるいは3種といった異なった物質の特異的鑑別が可能であり、生物学的研究領域において幅広く活用されている。蛍光抗体法で多重染色を行う場合には、反応動物種が異なる二次抗体を複数使い、各抗原を区別して検出するため、各一次抗体の免疫動物は異なっている必要がある。その為、これまで同一免疫動物抗体を二重染色する事は出来なかった。実績のある抗体が同じ免疫動物であることも多く、抗体を新たに変更する労力は計り知れない。そこで、パーキンエルマー社のTSA(Tyramide Signal Amplification)というシグナル増幅法を応用することで、同一免疫動物抗体の二重染色が可能であったので、その方法を紹介する。

1. 原理

通常免疫染色（蛍光抗体法）は異なる免疫動物抗体（一次抗体）をメーカー推奨の濃度に希釈して反応させる。次にそれぞれの一次抗体に交差性のある蛍光二次抗体を同じく希釈して混ぜあわせて反応させる事で二重染色を行う（図1）。

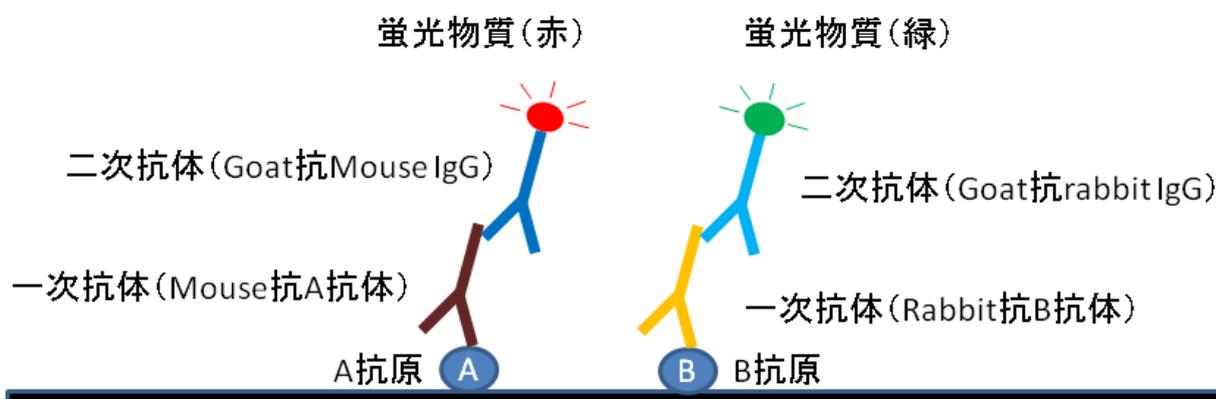


図1. 蛍光抗体法の原理

しかし、同一免疫動物種の2つの一次抗体を用いた場合は二次抗体の色を変えても、いずれの二次抗体にも交差性があるため、色分けして標識することが出来ない（図2）

2. 方法

2.1. 抗体希釈濃度の決定

TSA シグナル増幅を使用する一次抗体（この場合 Rabbit 抗 A 抗体とする）を希釈し、通常の蛍光抗体法で二次抗体を用いて可視化されない濃度を決定しておく。

2.2. 染色プロトコール

| TSA Plus Biotin System | |
|---|--|
| 1回目の染色 | |
| 0.3% H ₂ O ₂ で内因性ペルオキシダーゼ活性を消去 | |
| PBS で洗浄 (10min × 3回), Blocking 30min (TSA 用 Blocking solution + 5% NGS) | |
| 一次抗体 (Rabbit 抗 A 抗体) を反応 (RT で 3hr or 4°C で overnight) | |
| 0.3% Triton-X 100 in 0.1 M PBS で洗浄 (10min × 3回) | |
| HRP labeled secondary antibody (rabbit, 1/500 in PBS, RT, 2hr) | |
| PBS で洗浄 (20min × 3回) | |
| Tyramid - Biotin (1/50 in Amp. diluent, 10 min, RT) | |
| 0.3% Triton-X 100 in 0.1 M PBS で洗浄 (10min × 3回) | |
| Streptavidin Alexa Fluoro 488 (1/1000 in TSA 用 BS, 2hr, RT, 遮光) | |
| 0.3% Triton-X 100 in 0.1 M PBS で洗浄 (20min × 3回) | |
| 2回目の染色 | |
| 一次抗体 (Rabbit 抗 B 抗体) を反応 (RT で 3hr or 4°C で overnight) | |
| PBS で洗浄 (20min × 3回) | |
| 二次抗体 (Goat anti-Rabbit IgG Alexa 594) を反応 (RT で 3hr or 4°C で overnight) | |
| PBS で洗浄 (20min × 3回), DW で洗浄 | |
| 退色防止剤入り封入剤で封入後, 蛍光顕微鏡観察 | |

図 4. 染色プロトコール

3. 利点と欠点

利点としては、TSA は極めて強い増感作用のため、蛍光色素の退色などの影響を気にすることなく、簡単に多重染色が行え、また一次抗体の使用量が減らせるため低コストである。一方、欠点としては、行程に時間がかかること、1 回目の抗体希釈濃度決定をする手間がかかること、そしてバックグラウンドが高くなることも挙げられる。また、常に特異的鑑別ができているかをチェックする必要があるため、ネガティブコントロール（2 回目一次抗体を抜いて染色）の作成が必要である。

4. まとめ

同一動物種で作られた 2 つの抗体を、パーキンエルマー社 TSA シグナル増幅法を応用すれば蛍光抗体法において色分けして標識することが出来る。本方法は貴重な抗体や実績のある抗体を変える必要がなく、かつ抗体の節約にもなる画期的な染色法である。