

細胞・組織染色の達人

実験を正しく組む、行う、解釈する免疫染色とISHの鉄板テクニック

Contents

◆ 序文	3
◆ 動画視聴のご案内	8

序章 染色をはじめる前に考えること

- 1 免疫染色と *in situ* Hybridization 2 蛍光か発色か? 3 染色をはじめるにあたって、最初に考えること

第1章 動物の解剖と固定

1 動物実験をはじめる前に	14
1 適切な動物実験を行うための一般原則 2 適正な動物飼育を行うための動物福祉 3 マウス・ラットの試料採取に必要な麻酔薬と安楽死処置 4 最後に	
2 切片・固定液の種類と器具の準備	20
1 切片の種類 2 動物の解剖～切片作製までの流れ 3 固定液の種類と組成 4 解剖，灌流固定に用いる実験器具	
3 解剖，灌流固定法の実際	27
1 灌流固定か，浸漬固定か? 2 灌流固定の方法	

第2章 組織のサンプリング

1 灌流固定を必要とする組織	34
1 脳 2 下垂体 3 脊髄 4 後根神経節 5 肝臓 6 腎臓，副腎 7 膵臓 8 脾臓 9 気管+甲状腺 10 胸腺 11 唾液腺 12 舌(有郭乳頭) 13 白色脂肪，褐色脂肪 14 子宮，卵巣 15 乳腺	

2	灌流固定を必要としない組織	56
	1 胃, 十二指腸 2 小腸, 大腸 3 皮膚 4 眼 5 骨組織①: 大腿骨 6 骨組織②: 膝関節 7 骨組織③: 内耳 (蝸牛) 8 骨組織④: 歯 (下顎) 9 血管 10 胎仔, 新生仔, 胎盤 11 筋肉 12 精巢, 精巢上体 13 ゼノグラフト	
3	どちらでもよい組織	76
	1 心臓 2 骨髄 3 膀胱 4 肺	
4	培養細胞のサンプリング	80
	1 調製方法の種類と選び方 2 プロトコール 3 染色例	

第3章 ブロック作製

1	組織の前処理	88
	1 パラフィン包埋のための固定後の処理 2 脱脂 3 脱灰	
2	パラフィンブロックの作製 (包埋)	94
	1 パラフィン包埋 2 ブロックの成形 3 パラフィンブロックの保存	
3	凍結ブロックの作製	99
	1 未固定凍結ブロックの作製 2 既固定凍結ブロックの作製 3 凍結ブロックの保存	

第4章 薄切

1	パラフィン切片の作製と保存	104
	1 切片の厚み 2 パラフィン切片作製の手順 3 パラフィン切片の保存	
2	凍結切片の作製と保存	111
	1 凍結切片作製時の温度・厚さ 2 凍結切片作製の手順	

第5章 免疫組織化学染色

1	抗体を選ぶ	116
	1 抗体の候補を選ぶ 2 候補の絞込	
2	染色の流れ	120
	1 条件検討に用いる切片の準備 2 脱パラフィン～前処理 (抗原賦活化, 各種ブロッキングなど) 3 一次抗体反応 4 検出系	

3 免疫染色の準備	126
1 器具 2 試薬 (LSAB 法) 3 ABC 法, ポリマー法, mouse on mouse で使用する試薬	
4 免疫染色プロトコール (LSAB 法)	131
1 作業前の準備 2 プロトコール 3 簡易プロトコール	
5 染色結果を評価する	136
1 免疫染色の条件検討 2 免疫染色の答え合わせ	

第6章 *in situ* ハイブリダイゼーション (ISH)

1 ISHの原理	140
1 プローブの種類 2 ISHの手順 3 染色のコントロールのとり方	
2 プローブの設計	144
1 設計の注意点 2 設計方法	
3 プローブを作製する	147
1 設計した遺伝子配列の増幅 2 プローブ領域のクローニング 3 <i>in vitro</i> transcription 反応によるDIG 標識 RNA 合成 4 ドットプロット法によるプローブの濃度測定	
4 ISH 染色	154
1 準備 2 染色条件の設定 3 プロトコール 4 染色例	

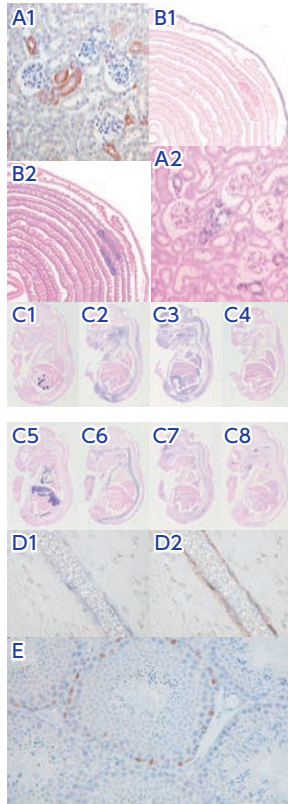
第7章 多重染色, その他の染色

1 ISH (発色) +免疫染色 (発色)	170
1 二重染色の条件検討 2 二重染色の手順	
2 免疫染色+免疫染色	173
1 免疫染色 (発色) +免疫染色 (発色) 2 免疫染色 (蛍光) +免疫染色 (蛍光)	
3 HE 染色	178
1 試薬 2 プロトコール	
4 TUNEL 染色	180
1 TUNEL 染色の原理 2 プロトコール	

達人への歩

- | | | | |
|---------------------------|-----|-------------------------|-----|
| ① サンプルや染色方法によって固定液を選ぶ | 22 | ⑪ プラスミドからの RNA 合成用鋳型調製 | 150 |
| ② 大切なシグナルを失わないための灌流固定 | 32 | ⑫ プローブのアルカリ処理に要注意 | 153 |
| ③ 灌流固定による組織の形態の変化 | 44 | ⑬ 最適な ProK 濃度の探し方 | 158 |
| ④ PCR 法を用いたマウス胎仔の性別判別法 | 72 | ⑭ ハイブリチャンバーの気密性と湿度調節 | 161 |
| ⑤ 溶剤の使い回しはほどほどに | 95 | ⑮ 長すぎるハイブリ時間にご用心 | 163 |
| ⑥ RNase にはどこまで気をつければ良いのか? | 105 | ⑯ ISH 発色停止のタイミング | 165 |
| ⑦ 湿度が染色の成否を左右する?! | 107 | ⑰ カウンターステインの種類とコツ | 166 |
| ⑧ 使える抗体は Google 先生に聞こう | 118 | ⑱ ISH の検出感度と遺伝子の発現分布 | 168 |
| ⑨ 臨床検体での ISH | 142 | ⑲ 二重染色ができない組み合わせの抗体について | 177 |
| ⑩ ISH のネガコンはセンス鎖のみでよいのか? | 143 | | |

カバー写真解説



A : マウス腎臓の免疫染色 (A1) および *in situ* ハイブリダイゼーション (A2)

B : マウス腸管ロールの *in situ* ハイブリダイゼーション (B1) および HE 染色 (B2)

C : マウス胎仔矢状断の *in situ* ハイブリダイゼーション (C1~C8 ; 8 種類のプローブ)

D : マウス血管の *in situ* ハイブリダイゼーション (D1) および二重染色 (D2 ; *in situ* ハイブリダイゼーション+免疫染色)

E : マウス精巢の免疫染色