

細胞・組織染色の達人

実験を正しく行い、解釈する。免疫染色・ISHと画像解析の超鉄板テクニック

Contents

◆ 改訂の序	3
◆ 初版の序	4
◆ 動画視聴のご案内	10

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	16
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 人道的エンドポイント 5 最後に	
2 切片・固定液の種類と器具の準備	24
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	31
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	38
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	60
1 胃、十二指腸 2 小腸、大腸 3 腸管ロール 4 皮膚 5 眼 6 骨組織①：大腿骨 7 骨組織②：膝関節 8 骨組織③：内耳（蝸牛） 9 骨組織④：歯（下顎） 10 血管 11 胎仔、新生仔、胎盤 12 筋肉 13 精巣、精巣上体 14 ゼノグラフト、ヒト・大動物組織など	

3	どちらでもよい組織	84
	1 心臓 2 骨髄 3 膀胱 4 肺	
4	培養細胞のサンプリング	88
	1 調製方法の種類と選び方 2 プロトコル 3 染色例	

第3章 ブロック作製

1	組織の前処理	96
	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）	102
	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	108
	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	114
	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	123
	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	128
	1 抗体の候補を検索 2 候補の絞込 3 Q&A	
2	染色の流れ	135
	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	141
	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	免疫染色プロトコル（LSAB法）	146
	1 作業前の準備 2 プロトコル 3 簡易プロトコル	
5	染色結果を評価する	152
	1 免疫染色の条件検討 2 免疫染色の答え合わせ	

6 二重染色

155

1 二重染色の条件検討 2 二重染色の手順

第6章

蛍光免疫組織化学染色

1 抗体を選ぶ・条件検討

160

1 一次抗体を選ぶ際の注意点 2 蛍光標識の二次抗体 3 条件検討

2 蛍光免疫染色の準備

163

1 器具 2 試薬

3 蛍光免疫染色プロトコール

165

1 作業前の準備 2 プロトコール 3 染色例

第7章

in situ ハイブリダイゼーション (ISH)

1 ISHの原理

170

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

174

1 設計の注意点 2 設計方法

3 プローブを作製する

177

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 *in vitro* 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

184

1 準備 2 染色条件の設定 3 プロトコール 4 染色例

第8章

多重染色，その他の染色

1 ISH (発色) +免疫染色 (発色)

206

1 二重染色の条件検討 2 二重染色の手順

2 HE 染色

209

1 試薬 2 プロトコール

3 TUNEL 染色

211

1 TUNEL 染色の原理 2 プロトコール

第9章

画像解析

1 バーチャルスライドによる染色画像の取得

218

1 ImageJ と HALO の比較 2 バーチャルスライドによる染色画像の取得 3 スキャンした画像の閲覧

2 ImageJ を用いた陽性部位の面積測定

222

1 解析画像の準備 2 ソフトのインストール 3 色分解により測定したい色を抽出する 4 面積を測定する 5 複数画像の測定の際に単位を合わせたい場合

3 HALO を用いた陽性部位の面積測定

227

1 画像解析の手順 2 解析結果の確認

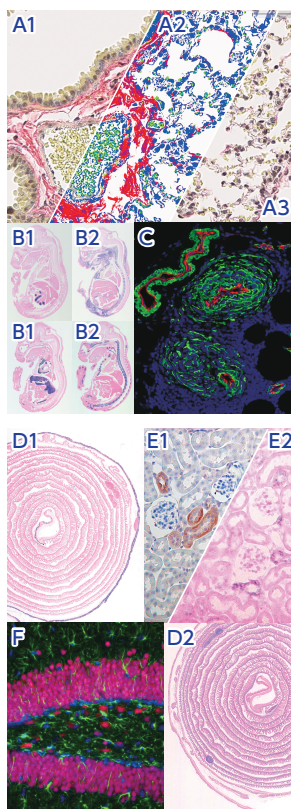
◆ 索引

231

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 | 26 | ⑩ 最適な ProK 濃度の探し方 | 188 |
| ② 大切なシグナルを失わないための灌流固定 | 36 | ⑪ ハイブリチャンバーの気密性と湿度調節 | 191 |
| ③ 灌流固定による組織の形態の変化 | 48 | ⑫ 長すぎるハイブリ時間にご用心 | 193 |
| ④ PCR 法を用いたマウス胎仔の性別判別法 | 79 | ⑬ ISH 発色停止のタイミング | 195 |
| ⑤ 溶剤の使い回しはほどほどに | 103 | ⑭ カウンターステインの種類とコツ | 196 |
| ⑥ RNase にはどこまで気をつければ良いのか? | 116 | ⑮ ISH の検出感度と遺伝子の発現分布 | 198 |
| ⑦ 湿度が染色の成否を左右する?! | 118 | ⑯ 核酸医薬や遺伝子治療の分野における ISH | 199 |
| ⑧ スライドガラス変われば染色像変わる | 122 | ⑰ その細胞, ヒト由来? マウス由来? | 200 |
| ⑨ 使える抗体は Google 先生に聞こう | 130 | ⑱ 組織染色で死細胞を判断する新しい指標? | 201 |
| ⑩ DAB の発色を見えやすくする | 151 | ⑲ 空間トランスクリプトーム解析用の品質確認 | 202 |
| ⑪ 二重染色ができない組み合わせの抗体について | 158 | ⑳ 古代試料 DNA が残っている細胞はどれ? | 203 |
| ⑫ 臨床検体での ISH | 172 | ㉑ 細胞数計測? 面積測定? | 229 |
| ⑬ ISH のネガコンはセンス鎖のみでよいのか? | 173 | ㉒ 線維化の面積測定: マッソントリクローム vs シリウスレッド | 230 |
| ⑭ プラスミドからの RNA 合成用鋳型調製 | 180 | | |
| ⑮ プローブのアルカリ処理に要注意 | 183 | | |

カバー写真解説



A : 線維化を可視化するシリウスレッド染色 (A1, A3) および HALO を用いた画像解析の証跡 (A2)

B : マウス胎仔矢状断の in situ ハイブリダイゼーション (B1~B4 : 4 種類のプローブ)

C : ヒト結腸癌の蛍光免疫染色 (緑 : α SMA, 赤 : CD31, 青 : DAPI)

D : マウス腸管ロールの in situ ハイブリダイゼーション (D1) および HE 染色 (D2)

E : マウス腎臓の免疫染色 (E1) および in situ ハイブリダイゼーション (E2)

F : マウス海馬歯状回の蛍光免疫染色 (緑 : GFAP, 赤 : NeuN, 青 : DAPI)