

# 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

<b>1 動物実験をはじめる前に</b>	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	
<b>2 切片・固定液の種類と器具の準備</b>	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	
<b>3 解剖、灌流固定法の実際</b>	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

<b>1 灌流固定を必要とする組織</b>	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 脾臓    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 乳房	
<b>2 灌流固定を必要としない組織</b>	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 骨髓 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 プロトコール 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、各種プロッキングなど）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 免疫染色プロトコール（LSAB法）

146

- 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

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

①シリウスレッド染色 ②マッソントリクローム染色 ③クリューバー・バレラ染色 ④トルイジン青染色 ⑤PAS染色

## 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

①ImageJ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

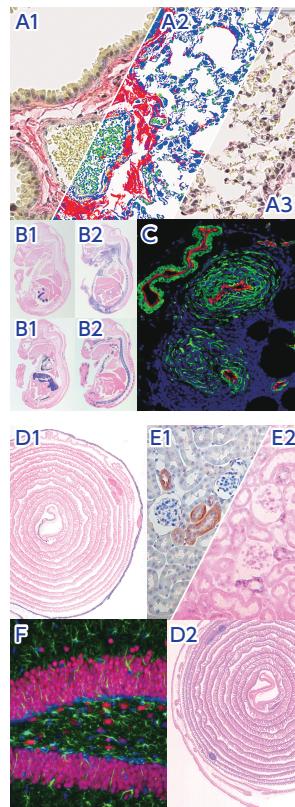
①画像解析の手順 ②解析結果の確認

## ◆索引

231

## 達人への 一歩

①サンプルや染色方法によって固定液を選ぶ	26	⑯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	⑰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	⑱長すぎるハイブリ時間にご用心	193
④PCR法を用いたマウス胎仔の性判別法	79	⑲ISH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	⑳カウンターステインの種類とコツ	196
⑥RNaseにはどこまで気をつければ良いのか?	116	㉑ISH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	㉒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	㉓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	㉔組織染色で死細胞を判断する新しい指標?	201
⑩DABの発色見えやすくする	151	㉕空間トランск립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	㉖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	㉗細胞数計測?面積測定?	229
⑬ISHのネガコンはセンス鎖のみでよいのか?	173	㉘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 :  $\alpha$ 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)