

免疫染色の達人が答えるトラブル解決 Q&A 100

なぜ私のサンプルは染まらないのか？ 固定・包埋・薄切・染色の落とし穴と試薬選びのポイント

目次

◆ 序文	3
------------	---

第1章 事前の検討：手法の選択

Q1 器具は何を揃えればよいのでしょうか？	12
Q2 固定に関して、 常に灌流固定を選択したほうがよいのでしょうか？	14
Q3 染色に用いる抗体の説明書に「凍結切片とパラフィン切片の両方が対応」と 記載されているときはどちらを選択すればよいのでしょうか？	16
Q4 ゼノグラフト組織でヒトとマウスの細胞を染め分けることは可能でしょうか？	18
Q5 マウスにヒト細胞を移植した組織で、ヒト由来のタンパク質のみを検出したいです	19
Q6 培養細胞を染色したいのですがどんな方法がありますか？	21

第2章 切片作製まで：解剖～固定

Q7 固定液はみんなが使っている4%パラホルムアルデヒドでいいですよね？	24
Q8 免疫染色用の組織の固定を4℃で行う方法もあると聞いたのですが、 室温と比べてどちらがよいのでしょうか？	26
Q9 灌流固定が上手くなるポイントを教えてください	27
Q10 灌流固定後の浸漬固定の時間は、 どのくらいがよいのでしょうか？	29
Q11 ホルマリン以外の固定液を使用しても染色できますか？	30
Q12 最近話題のグリオキサル固定液について、 他の固定液との違いや選択方法などを教えてください	32
Q13 細胞培養したカルチャーインサートを使って凍結切片を作製すると、 スライドガラスに貼り付けたサンプルが剥がれてしまいます	34

Q14	魚類など、マウス以外の生物の灌流固定はできますか？	35
Q15	ヒト組織の採取を行う場所に固定液を持ち込めない場合、どうすればよいですか？	36
Q16	ブロックの保存方法について教えてください	37
Q17	同じ組織を使って組織染色、遺伝子発現、タンパク質解析、酵素活性測定の試験を行いたいです。分解を避けるために組織固定を優先した方がよいですか？	39

第3章 切片の前処理：脱脂・脱灰，包埋，薄切

Q18	パラフィン包埋は一般的ないわゆる病理用の方法でよいのでしょうか？	42
Q19	エタノール～キシレン，パラフィンへの置換時間の目安を教えてください	44
Q20	灌流固定を行った組織片を凍結切片にするにはどうすればよいですか？	47
Q21	各工程の作業環境の温度は何℃がよいですか？	48
Q22	ブロックの薄切時は冷やして切った方がよいですか？	50
Q23	スライドの種類にはどのようなものがありますか？ どう使い分けますか？	51
Q24	疎水性と親水性のスライドガラスで使用法に違いはありますか？	53
Q25	脳，脊髄の染色でAPSのスライドガラスを選択する理由は？	55
Q26	同じサンプルでもスライドガラスを変えると形や大きさが変わってしまうのですが、なぜでしょうか？	56
Q27	骨を含む組織の脱灰には、EDTA系の試薬と塩酸系の試薬とでどのような違いがあるのでしょうか？	57
Q28	脂肪が多い組織を免疫染色する場合の注意点を教えてください	58
Q29	切片の厚みは何μmがよいのでしょうか？	59
Q30	パラフィンブロック薄切時の湯伸ばしで、長時間お湯に浮かべてもシワが伸びないとき、どうすればよいのでしょうか？	60
Q31	凍結切片をスライドガラスに貼り付ける際に、シワや気泡が入ってしまいます	61
Q32	切片の保存方法について教えてください	63

第4章 染色工程：抗体選び，染色法

1) 抗体関連

- Q33** 目的の抗体がいろいろなメーカーから販売されていて、探し方と選び方がわかりません 66
- Q34** 同じクローンのモノクローナル抗体が複数の会社から販売されているときはどのような基準で選択すればよいのでしょうか？ 71
- Q35** 検体と一次抗体の産生動物を変える理由は何ですか？ 72
- Q36** マウス組織を染色したいのですがどうしてもマウス抗体しか見つかりません。どうすればよいのでしょうか？ 74
- Q37** 非モデル生物で免疫染色を行うときの抗体の選び方は？ 76
- Q38** 抗体の最適な濃度の条件検討はどのように行うのですか？ 77
- Q39** 抗体の原液濃度が記載されていないときはどうすればよいのでしょうか？ 79
- Q40** 一度染色に用いた抗体を回収して使い回せるのでしょうか？ 81
- Q41** 抗体はドライアイスを入れて冷凍で輸送してよいですか？ 82
- Q42** アイスotypeコントロール抗体での染色は必要でしょうか？ 83
- Q43** 目的タンパク質にタグを付加して発現させたいのですが、免疫染色で検出できるタグを教えてください 84

2) 染色工程関連

- Q44** 染色工程ってどれくらいの時間がかかりますか？ 86
- Q45** 冷蔵・冷凍していたブロックや切片を用いて作業するとき、どのように温度を戻せばよいのでしょうか？ 88
- Q46** 分子病理は行わず HE 染色のみの場合、切片の保存温度は室温でよいのでしょうか？ 90
- Q47** 脱パラフィン前のベーキングは意味がありますか？ 91
- Q48** 過酸化水素処理はなぜ行うのですか？ 92
- Q49** ブロッキング剤の種類と使い分けについて教えてください 93
- Q50** 色々なブロッキングがあるようですが何をすればよいのでしょうか？ 94
- Q51** 二重染色を行いたいのですが、明視野と蛍光のどちらが良いのでしょうか？ 95

Q52	発色法で二重染色をするときも、一次抗体は別々の動物から作られたものを使う必要がありますか？	97
Q53	発色法の二重染色に必要な条件検討について教えてください	98
Q54	同じ切片を二重染色するのと、連続切片またはミラー切片で染色するのと、どのように使い分ければよいのでしょうか？	100
Q55	抗原賦活化を熱処理で行う場合、バッファーや処理条件はどうやって選べばよいのでしょうか？	101
Q56	骨、軟骨、内耳など硬組織のパラフィン切片が熱処理で剥がれてしまいます	103
Q57	マイクロウェーブで賦活化を行うとムラができてしまいます	104
Q58	一次抗体を反応させる温度は4℃と室温と37℃とで違いが出るのでしょうか？	105
Q59	検出法としてLSAB法/ABC法/イムノポリマー法のどれを選ぶべきですか？	106
Q60	最適なDAB染色時間の決め方を教えてください	109
Q61	発色を確認する時の顕微鏡の設定について教えてください	110
Q62	リン酸化抗体で染色する場合、PBSを使用してはダメなのでしょうか？	112
Q63	抗体反応後の洗浄液はTBSとPBSのどちらがよいのでしょうか？ また界面活性剤は入れたほうがよいのでしょうか？	114
Q64	同じ抗体を用いて蛍光法と発色法で染色する場合、 賦活化方法や抗体濃度は同じでよいのでしょうか？	115
Q65	カウンターステインは必要ですか？	117
Q66	封入を失敗しました。やり直し可能ですか？	119
Q67	アルカリホスファターゼ標識抗体を用いて発色させたシグナルが、 封入したら消えてしまいました。なぜですか？	121

3) 蛍光染色関連

Q68	同じ分子を発色と蛍光で観察したとき、見え方はどう違いますか？	122
Q69	蛍光法で二重染色を行う際の一次抗体の選び方について教えてください	124
Q70	蛍光観察を行う際は何色が良いですか？	125
Q71	組織中の蛍光タンパク質をそのまま観察できますか？	127
Q72	蛍光バーチャルスライドのメリット・デメリットについて教えてください	129
Q73	蛍光染色の場合、切片の厚みはどのくらいがよいのでしょうか？	131
Q74	封入剤の選び方、使い方について教えてください	133

Q75	蛍光染色のスライドはどれくらいの間保存できますか？	134
Q76	二重染色の時の色の組み合わせはどのように決めればよいですか？	135
Q77	自家蛍光が気になります…	137
Q78	DAPI 染色がムラになってしまいます	139
Q79	TSA 法とはこういった手法なのですか？	141
Q80	ジェノスタッフでは蛍光標識二次抗体は何を使っていますか？	143

4) その他の染色

Q81	蛍光免疫染色の後に周辺組織の情報を得る方法がありますか？	145
Q82	TUNEL 染色の注意点を教えてください	146
Q83	線維化の評価方法について教えてください	147

第5章 結果の評価：検出感度，バックグラウンド，染色ムラ，画像解析・定量

Q84	初心者がやりがちなミスについて教えてください	150
Q85	ネガティブコントロール抗体でも色がついてしまいます	151
Q86	染まるブロックと染まらないブロックがあり，サンプル間のばらつきで困っています	153
Q87	はじめて行う染色なのですがシグナルが全く出ません。 どこを確認すべきでしょうか？	155
Q88	今まで染まっていた系なのに染まらなくなりました	157
Q89	非特異的発色を減らすにはどうすればよいですか？	159
Q90	ネガティブコントロールとポジティブコントロールは必須ですか？	160
Q91	染色条件を検討するにあたりポジコンのサンプルをどう準備したらよいですか？	162
Q92	異なる組織を同じ抗体で染色する場合，プロトコルは同じでよいですか？	164
Q93	シグナルが弱いのですがどう対処すればいいですか？	165
Q94	蛍光染色でバックグラウンドが高いのですが，どうすれば改善できますか？	166
Q95	組織の周辺部でバックグラウンドが強く染まってしまいます	167

Q96	メラニンが多い組織で免疫染色を行いたいですが、組織由来の色素とDAB染色を区別したいのですが、どうすればよいのでしょうか？	169
Q97	免疫染色の染色ムラを改善する方法を教えてください	171
Q98	使ってみたけれどもうまくいかなかった試薬や器具はありますか？	172
Q99	思ったようなシグナルが得られないときの諦めどころはどこですか？どこまで条件検討すればよいのでしょうか？	173
Q100	蛍光強度の定量について、異なる検体間での相対化をどのように行えばよいのでしょうか？	174
Q101	DAB染色の茶色のシグナルだけを抽出することはできますか？	175
Q102	画像解析を行う際、1つのサンプルから1断面の解析で十分ですか？	177
◆ 索引		178

関連書籍のご案内

本書の各Qの末尾は、プロトコール書籍『改訂 細胞・組織染色の達人』（羊土社、2023年）の対応するページを（ **達人** p141）のようにお示ししています。
あわせてご活用ください。

