

3 緩衝液

一般的にはリン酸緩衝食塩水 (PBS) やトリス塩酸緩衝液 (TBS) である。筆者はこれまで両方使用したことがあるが、特に差を感じたことはない。

1 PBS

Na_2HPO_4 (無水) 1.44g, KH_2PO_4 0.24g, NaCl 8g, KCl 0.2g を蒸留水に溶解して 1L にする。これで pH がほぼ 7.2 付近になるはずである。必要であれば pH を合わせる。

※PBSにはいろいろな組成があるので、基本的にはそれぞれの研究室で用意されているものを使用するのでかまわない。免疫染色で使用される PBS は通常 Ca^{2+} や Mg^{2+} を含まないことが多いようである。

筆者の研究室では、PBS を 10 倍濃度で作製してオートクレーブをかけ、それをミリ Q で 10 倍希釈してタンクに作製して使用している。

2 TBS

Trizma base 6.1g, NaCl 9g, を蒸留水に溶かして 1L にする。PH を 7.6 付近に合わせる。

これら緩衝液に界面活性剤, Tween20 や Triton X-100 を 0.1% になるよう加える (100 mL なら 100 μL) と, PBT とか, TBST となる。



染色過程

ここまでは蛍光抗体法でも酵素抗体法でも同様のプロトコールである。以下の内在性酵素の不活性化以降は酵素抗体法と蛍光抗体法で方法が変わってくる。

1 抗原賦活化

必ずしも抗原賦活化は必要なく、逆に行うことでバックグラウンドが高くなってしまうこともある。これについては、第 2 章—5 を参照されたい。

2 内在性酵素の不活性化

これは、染色過程最後のステップで、抗体の抗原への結合を可視化するためにどの酵素を使用するかによってどのように不活性化するかが決まる。前述した通り、現在よく使用されている酵素はペルオキシダーゼとアルカリホスファターゼであり、両者とも通常多くの組織に内在性の活性が認められる。

1 ペルオキシダーゼの不活性化

A) 過酸化水素による不活性化

ペルオキシダーゼの不活性化に一番よく用いられるのが過酸化水素 (H_2O_2)