



金コロイド免疫電顕法

【 著者 】 後藤友美、佐藤繭子、若崎真由美、武田紀子、豊岡公徳
【 公開日 】 2020. 5. 14
【 最終更新 】 2020. 5. 17

概要・原理

切片の表面に露出した抗原にそれに対する特異抗体を結合させ、結合した一次抗体を金コロイド標識二次抗体で可視化する方法である。

装置・器具・試薬

1. 試料

ニッケルグリッド上の超薄切片

2. 試薬

BSA(ウシ血清アルブミン)

TBS(トリス緩衝生理食塩水)*1

一次抗体

コロイド金標識二次抗体(Jackson ImmunoResearch 社の 6 nm, 12 nm, 18 nm gold 結合 Anti-Rabbit*2
IgG(H + L) antibody など)

蒸留水

酢酸ウラン

界面活性剤 (TritonX-100 など)

*1 10×TBS(トリス緩衝生理食塩水) 500 ml 作製

①トリス塩基 30.285 g、塩化ナトリウム 43.83 g を約 450 ml の純水で溶解する。

②pH を測定しながら塩酸を加え、pH7.5 に調整する。

③500 ml にメスアップする。

溶液はオートクレーブ滅菌して、冷蔵もしくは室温で保存可能

→使用する際は 10 倍希釈する。

*2 一次抗体の宿主動物 (免疫動物) に対応した二次抗体を選ぶ

3. 器具

・パラフィルム ・ピンセット(クロスピンセットが扱いやすい)

詳細

すべての反応はパラフィルムの上に置いた液滴にグリッドを沈める、もしくは浮かべて行う。
洗浄はパラフィルムで作ったポート等に TBS を入れて行う。

- 1) ブロッキング 10% BSA/TBS で 30 分
- 2) 洗浄 TBS で 5 分
- 3) 100 倍希釈の一次抗体(in TBS) 室温で 1 時間
- 4) 洗浄 TBS で 5 分 *界面活性剤を入れる場合も
- 5) 20 倍希釈の 2 次抗体(in 10% BSA/TBS) 室温で 30 分
- 6) 洗浄 TBS で 5 分 *界面活性剤を入れる場合も
- 7) 洗浄 DW 5 秒
- 8) グリッドを良く乾かす。
- 9) 4% 酢酸ウラン水溶液 10-15 分
- 10) 洗浄 DW 30 秒

工夫とコツ

1. 一次抗体の濃度

一次抗体の濃度は、ウエスタンブロッティングの 5-10 倍濃度、蛍光抗体染色法の 2-5 倍濃度から試すことを推奨する。ネガティブコントロールとして、免疫前血清、付くはずのない抗体、二次抗体のみの条件などでも処理しておく。

2. 洗浄

洗浄はパラフィルムで作ったポート等に TBS を入れ、ピンセットでグリッドを移動し、数分間洗浄する。ピンセットの先に一次抗体溶液が残りやすい場合があるので、濾紙で吸う。2~3 回 TBS で洗浄するなど工夫し、未反応の抗体を完全に除去することが重要である。非特異的な金粒子が多い場合は、0.01%~0.1% TritonX-100 など界面活性剤を加えて洗う。

3. 2 次抗体の金粒子のサイズ

5nm、6nm の金粒子は TEM 観察時に見えづらく、またサイズが大きくなるほど落ちやすいので、初めて単染色で免疫染色する場合は 10nm または 12nm を推奨する。

4. 二次抗体反応後の洗浄

二次抗体自体による非特異的な反応がない限り TBS に界面活性剤を入れる必要はない。TBS 洗浄後、TBS と酢酸ウラニルが混ざると沈殿を生じ、汚れの原因となるため DW で洗い、よく乾かす。

5. トラブルシューティング

5-1 金粒子が非特異的に付いている場合

→1 次抗体濃度を下げる。例：1/200 希釈、1/1000 希釈

- Wash 時に界面活性剤 TritonX-100 を加えてみる。例：0.05%または 0.1% TX100
- 1 次抗体を精製する。例：Melon Kit で IgG 精製、硫酸精製、抗原による Affinity 精製
- 反応時間を短くする。例：30min

5-2 金粒子が全く付いていない場合

- 1 次抗体濃度を上げる。例：1/50 希釈、1/10 希釈
- 反応時間を長くする。例：2 hr, 4°Cで over night
- 1 次抗体を精製する。例：Melon Kit で IgG 精製、硫酸精製、抗原による Affinity 精製
- 2 次抗体を間違えていないか確認する。例：anti-Rabbit IgG, Mouse, Rat

参考文献

佐藤繭子、後藤友美、豊岡公德：顕微鏡 vol.52 No.2 p98-103 (2017)