



テクニカル レポート 202:

# フレキシブル基底面培養細胞 の免疫蛍光法

Document: Immunofluorescent Techniques Tech Report, Rev 1.1

06-24-2009

*Culturing Cells in a Mechanically Active Environment™*  
Flexcell International Corporation • 437 Dimmocks Mill Road, Suite 28 • Hillsborough, NC 27278  
800-728-3714 • (919) 732-1591 • FAX: (919) 732-5196 • [www.flexcellint.com](http://www.flexcellint.com)

COPYRIGHT © 2009 FLEXCELL® INTERNATIONAL CORPORATION



## イントロダクション

BioFlex®, Flex I® などのフレキシブルな培養プレート基底に増殖する細胞におけるたんぱく質およびその他の細胞構造物を観察するのに、免疫蛍光は有用な技法です。

細胞の密度としては、コンフルエントに近いが過密でない状態で使用するのが観察に最適です。走査型コンフォーカル顕微鏡を用いている場合は、コンフルエントの度合はあまり重要になりません。しかしながら、従来の蛍光顕微鏡を用いている場合には、細胞が過密であると画像が重なり、特殊なたんぱく質（即ち、細胞骨格のフィラメント系）の観察はとりわけ困難になることがあります。

**ご注意：** シリコンラバーメンブレンには自蛍光があり、波長540–560 nm（赤色領域）で励起されると580–600 nmで検出される蛍光を放出します。それゆえ、タグ二次抗体としてローダミン（rhodamine）タグよりフルオレセイン（fluorescein）タグの方が観察するには優れているかもしれません。

## 方法

1. メディウムを細胞から吸引します。加温した無血清培養メディウム（pH7.2）で細胞を注意深く洗浄してください。洗浄メディウムをウェルの側壁へ当て、細胞が液の流れを直接受けないようにします。
2. 3.7%ホルムアルデヒドあるいはパラホルムアルデヒドのリン酸緩衝生理食塩水（PBS、pH7.2）、あるいは特に選定した固定液で細胞を固定します。
3. 細胞内たんぱく質を調べている方は、Nonidet-P40（0.1%）あるいはTriton X-100（0.1%）で5分間、細胞透過処理してください。透過化処理が原因で、細胞がシート状にラバーメンブレンから浮き上がる可能性があります。その場合には、細胞の付着状態に合わせて界面活性剤の濃度を下げてください。
4. PBSで3回、穏やかにリンスします（各1回当たり5分間）。
5. 1%ウシ血清アルブミン（BSA）含有のPBSで1回、5分間リンスします。
6. 一次抗体を0.5%BSA含有のPBSで希釈します。一次抗体希釈度は1:50から1:250の範囲にあるはずで、1:100という例が普通です。しかしながら、この条件については使用する一次抗体各々につき計算する必要があります。実験を行う前に、テスト細胞で濃度曲線を描いてその抗体に適切な条件を定めておくことをお勧めします。
7. フレキシブルボトム培養プレートにある試料の取り扱い法：
  - a. **Flex I® 培養プレート** Flex I® 培養プレートの基底で実験している場合は、メンブレン末端部周囲を下から優しく押し上げプラスチックのウェル壁から遊離することにより、ラバーメンブレン全体を注意深く持ち上げて、外すことができます。この時点で、メンブレンを別の6穴型培養プレートのウェルあるいは径100 mm培養ディッシュ内に移してください。ラバーの側縁部分をトリミングしてウェル周囲から離すこともできます。幾つかの異なる試料あるいは異なる抗体処理に用いたい場合は、Flex I® メンブレンをパイを分けるように扇形にカットし、各部分を個別に処理することができます。一片を二次抗体のみのコントロールとして用いることもできます。
  - b. **BioFlex® 培養プレート** BioFlex® 培養プレートの基底で実験している場合は、まず固定してターゲットたんぱく質を特異抗体で染色してください。免疫染色後、メンブレンを滅菌済みの鋭利な刃を用いてプレートから切り出し、スライドガラスに載せ、顕微鏡観察することができます。
8. この時点から先の技法では、細胞に加える抗体に関して、手持ちの抗体量および一枚のフレキシブルメンブレンに用いる異なる種類の抗体数などに従ってその方法を選択してください。



9. Flex I® 培養プレートフレキシブルボトムを扇形にカットした試料は以下のように操作できます：

- a. 径100 mm培養ディッシュを用意し、パラフィルム (Parafilm) その他の疎水性フィルムの円板を置きます。水をしみ込ませたスポンジの小片を培養ディッシュにおいて、試料の乾燥を防止します。フィルムに扇形の区画に分けて印をつけ、処理するメンブレン試料の位置を定めます。一次抗体の希釈溶液をパラフィルム上の特定域に、10-20  $\mu$ l おいてください。ラバーメンブレンの小片を、細胞培養面を一次抗体溶液に向けておきます。替りに抗体溶液をラバーメンブレン小片に直接滴下することもできます。細胞の上にパラフィルム片を載せても載せなくてもかまいません。試料標本を、反応の強度やその抗体の特性に従って、一時間あるいはそれ以上インキュベートします。一次抗体と細胞の反応として、通常一時間から数時間あれば十分です。
- b. 注意してラバーメンブレンを細胞面が上に向くように反し、細胞を0.5%BSA含有PBSで3回洗浄して(各1回当たり5分間)、余剰の未反応抗体を除去します。
- c. 二次抗体を、その抗体の基質との反応性にもとづき、1:100から1:500の範囲で希釈します。一次抗体で行ったと同じ条件で二次抗体を適用してください。
- d. 0.5%BSA含有PBSで3回リンス(各1回当たり5分間)します。

10. BioFlex® 培養プレートウェルの蓋が除かれ作業しやすくなったメンブレン試料は以下のように処理することができます：

抗体の量に制限されなければ、抗体をウェルの全表面に適用することもできます。数種の異なる抗体を単一ウェルに添加し、幾つかのテストを単一ウェルで行いたい場合は、抗体を付加した円板を載せることによりメンブレン上で区画に隔離して、区画に対し抗体の小滴一滴内で反応させることができます。それには、パラフィルム、ナイロンメッシュから小片ををカットするか、あるいは電子顕微

鏡用グリッドを用いて、一次抗体溶液の小滴(10  $\mu$ l)を包含させて細胞の上を囲みます。適用した抗体溶液は、上述されたFlex I® 試料のようにして反応させ、洗浄してください。

11. 小カバーガラスに、PBSあるいは低蛍光の標本封入剤を使用してください。
12. 使用する蛍光の励起 (excitation) および放出 (emission) に対応する特性フィルターを用いて試料の観察を行ってください。