

組織学総論

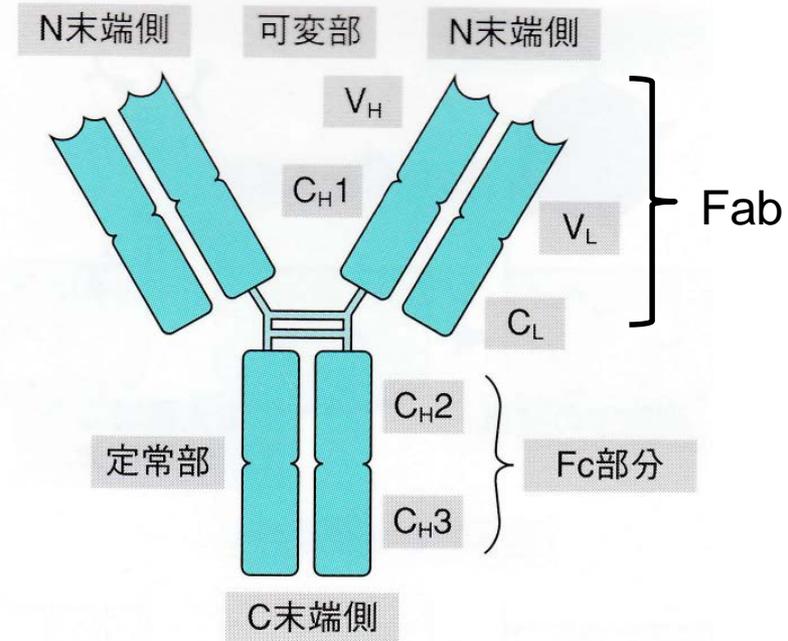
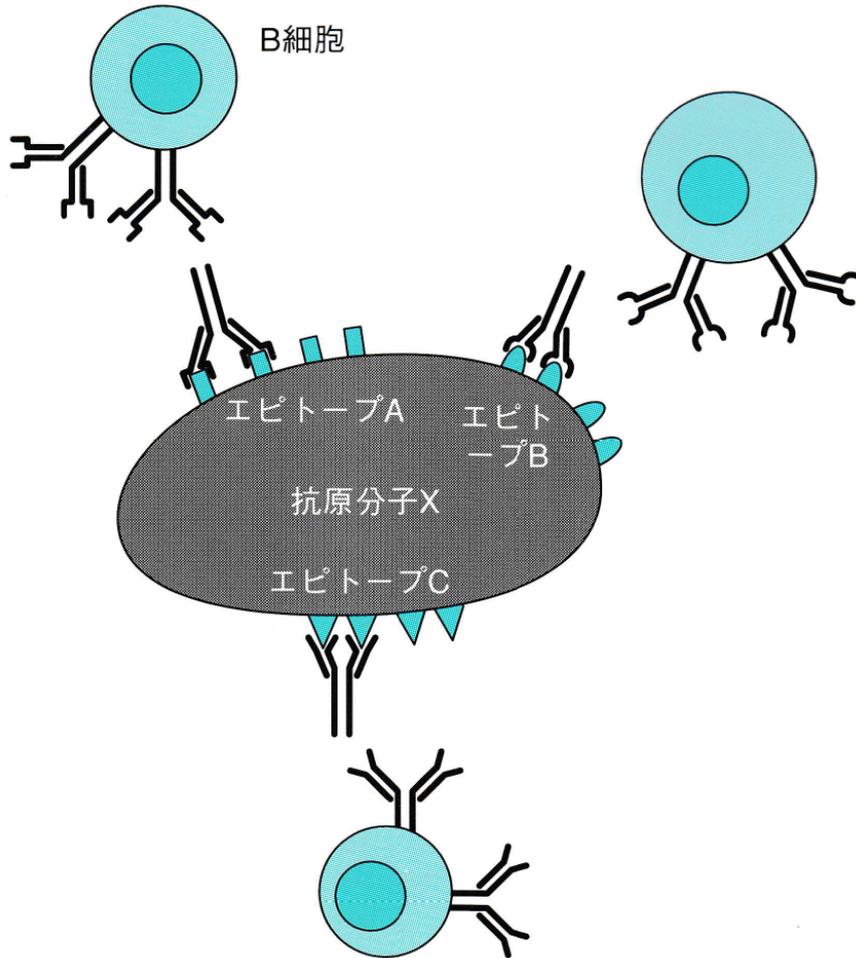
第3回 組織学研究法-2

金田 勇人 (Hayato Kaneda)
hayato@belle.shiga-med.ac.jp

今回のポイント

1. 免疫細胞/組織化学法
Immunocytochemistry
Immunohistochemistry
2. *In situ* ハイブリダイゼーション法
In situ hybridization

抗原と抗体

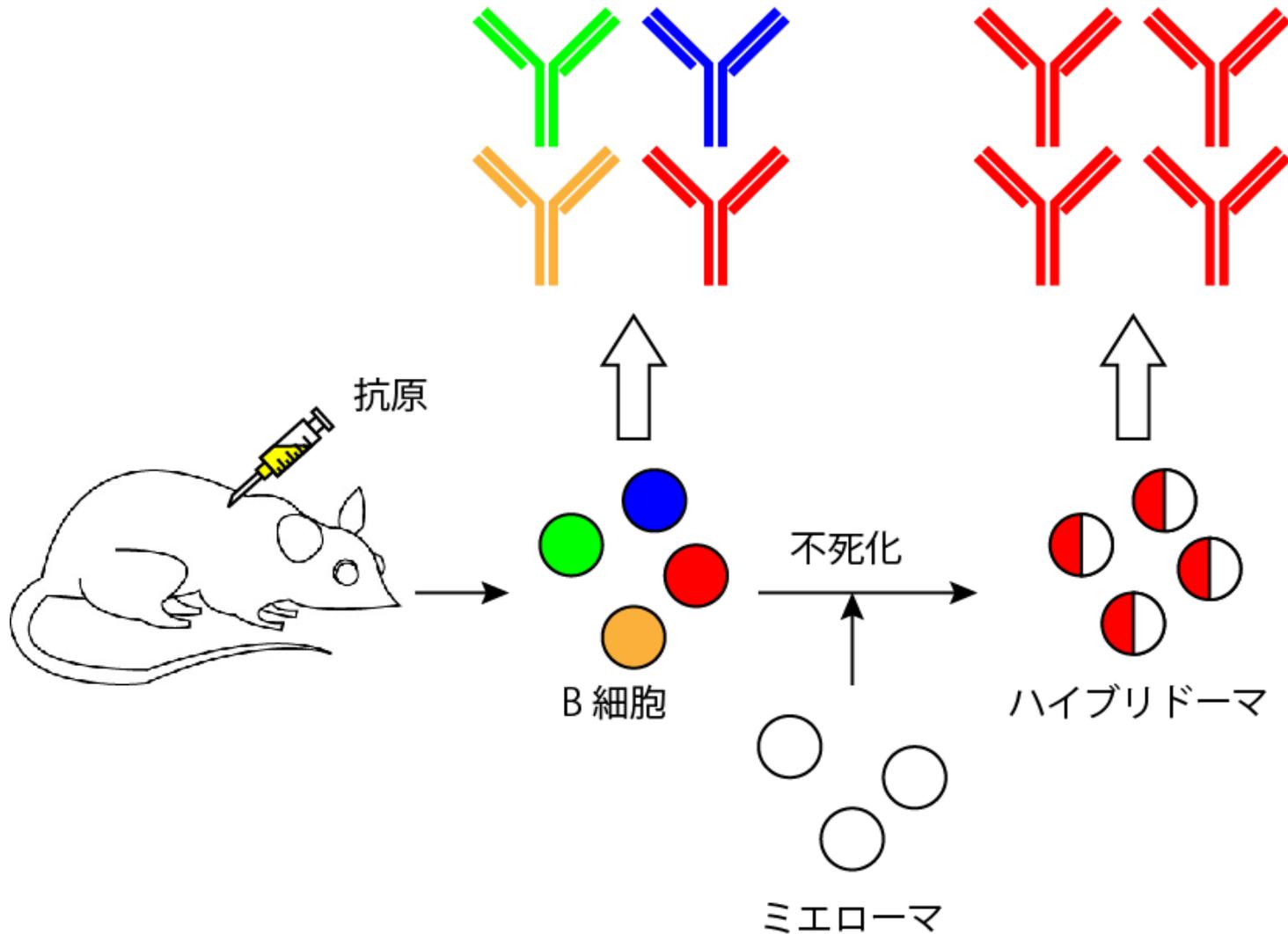


- 1つのB細胞は1種類の抗体を産生
- 1種類の抗体は特異的な抗原を認識し結合 (非特異的結合する場合もある)

- 特定のタンパク質などの分子を認識して結合する
- 重鎖 (Heavy chain) と軽鎖 (light chain) からなる
- Fc (fragment crystallizable region) と Fab (fragment antigen-binding region) を持つ

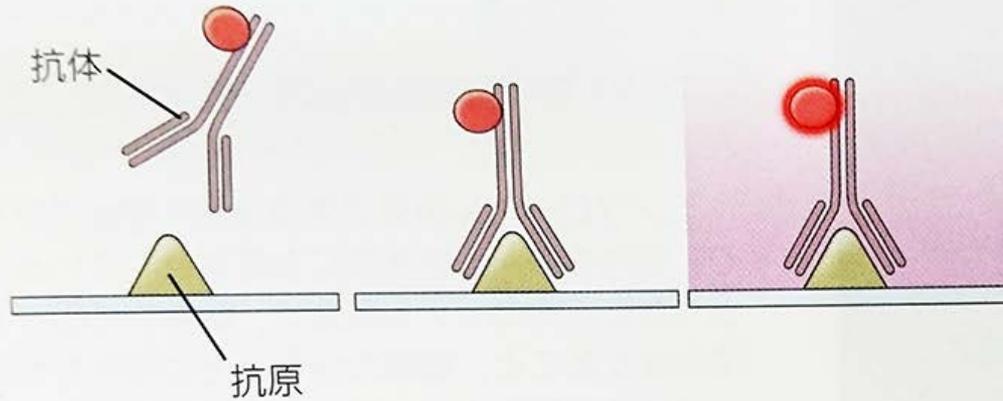
モノクローナル抗体とポリクローナル抗体

ポリクローナル抗体 モノクローナル抗体

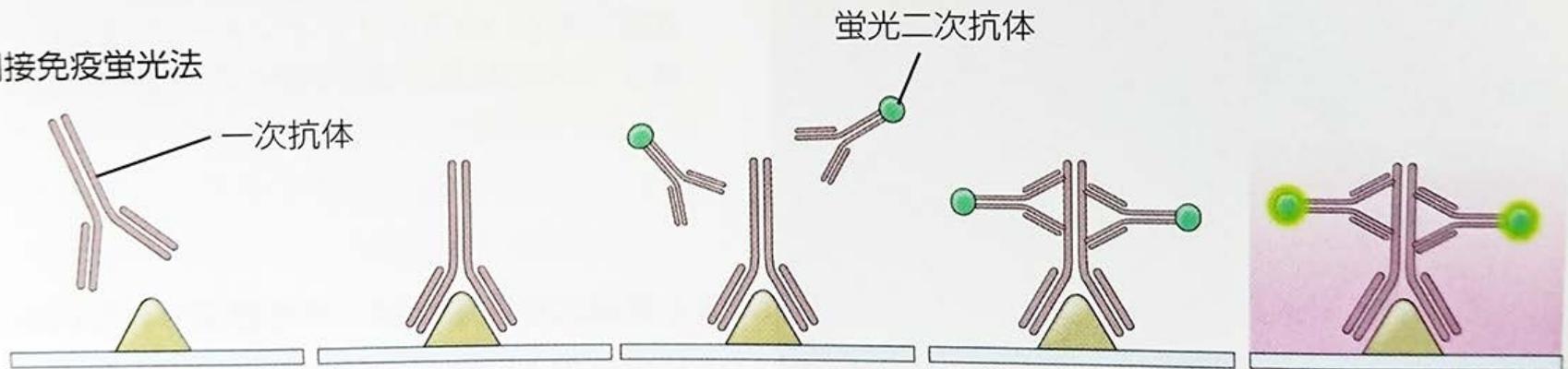


直接法と間接法

直接免疫蛍光法



間接免疫蛍光法



免疫組織化学染色

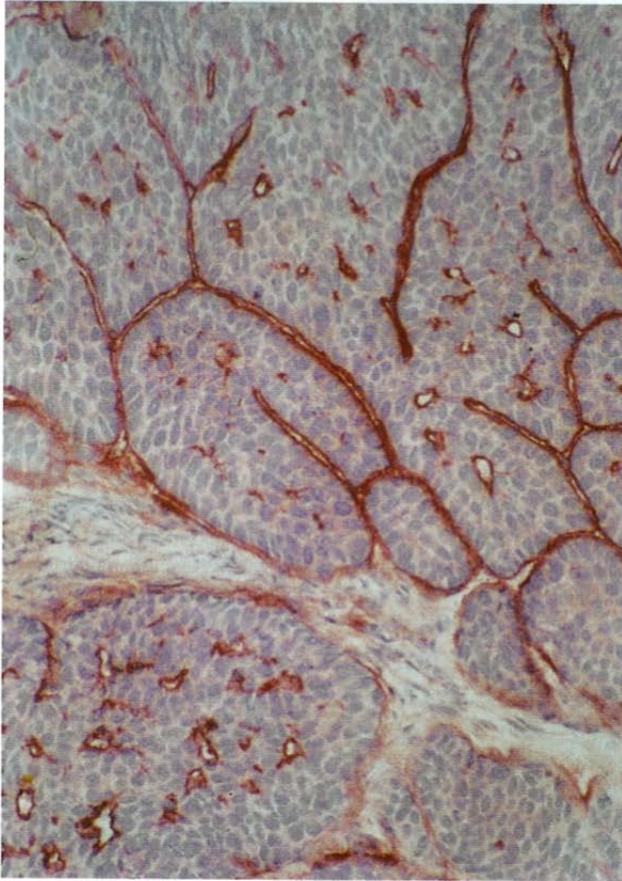
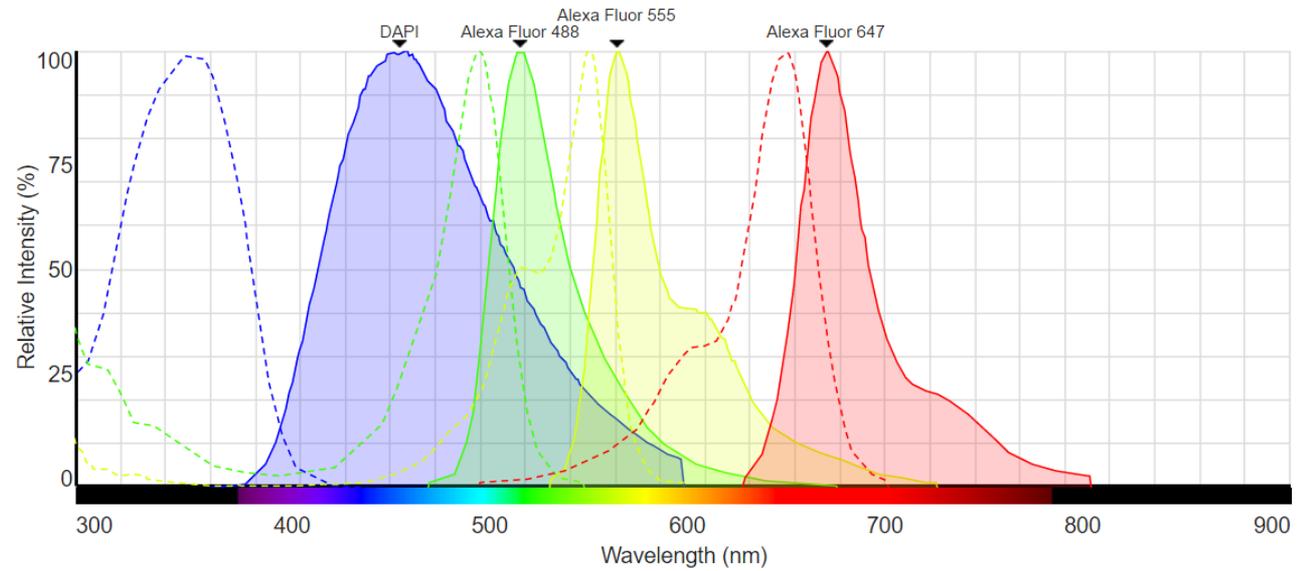
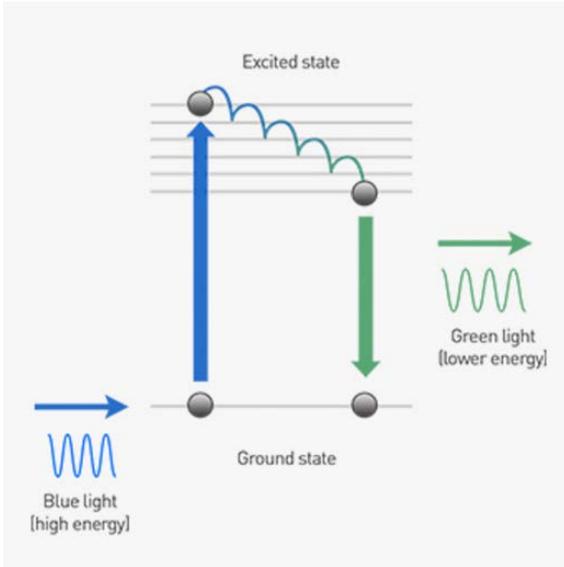


図1-5 間接法による免疫細胞化学の例。IV型コラーゲンに対する抗体を一次抗体として用い、アルカリホスファターゼ標識抗体を二次抗体として用いた。免疫反応陽性部位は赤く染色されており、特に悪性の腫瘍細胞周囲の基底膜上に強い陽性反応が見られる。(Kopf-

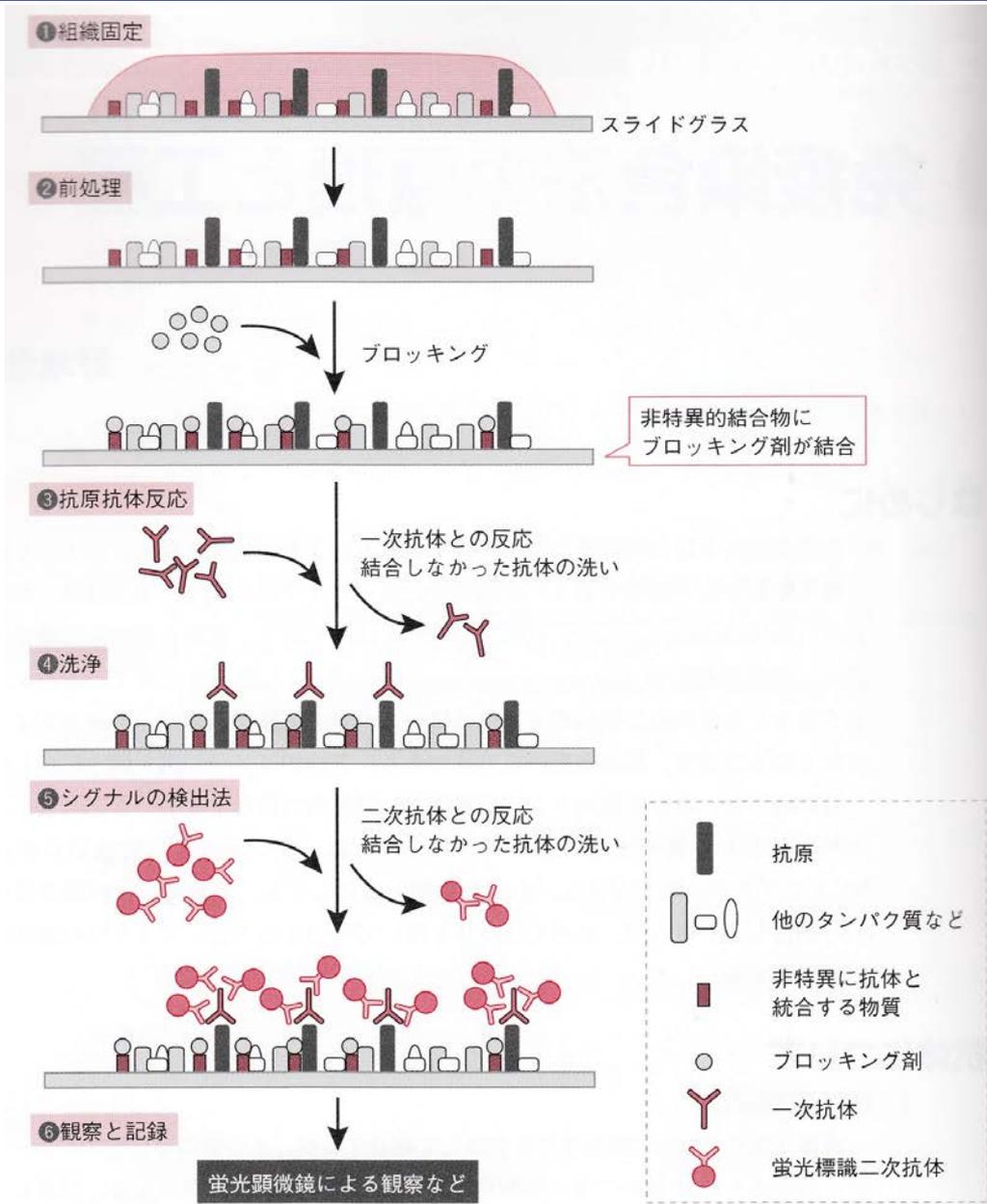
二次抗体をアルカリホスファターゼで標識し、酵素活性によって色素沈着を起こさせて分子の局在を検出する。

荧光色素



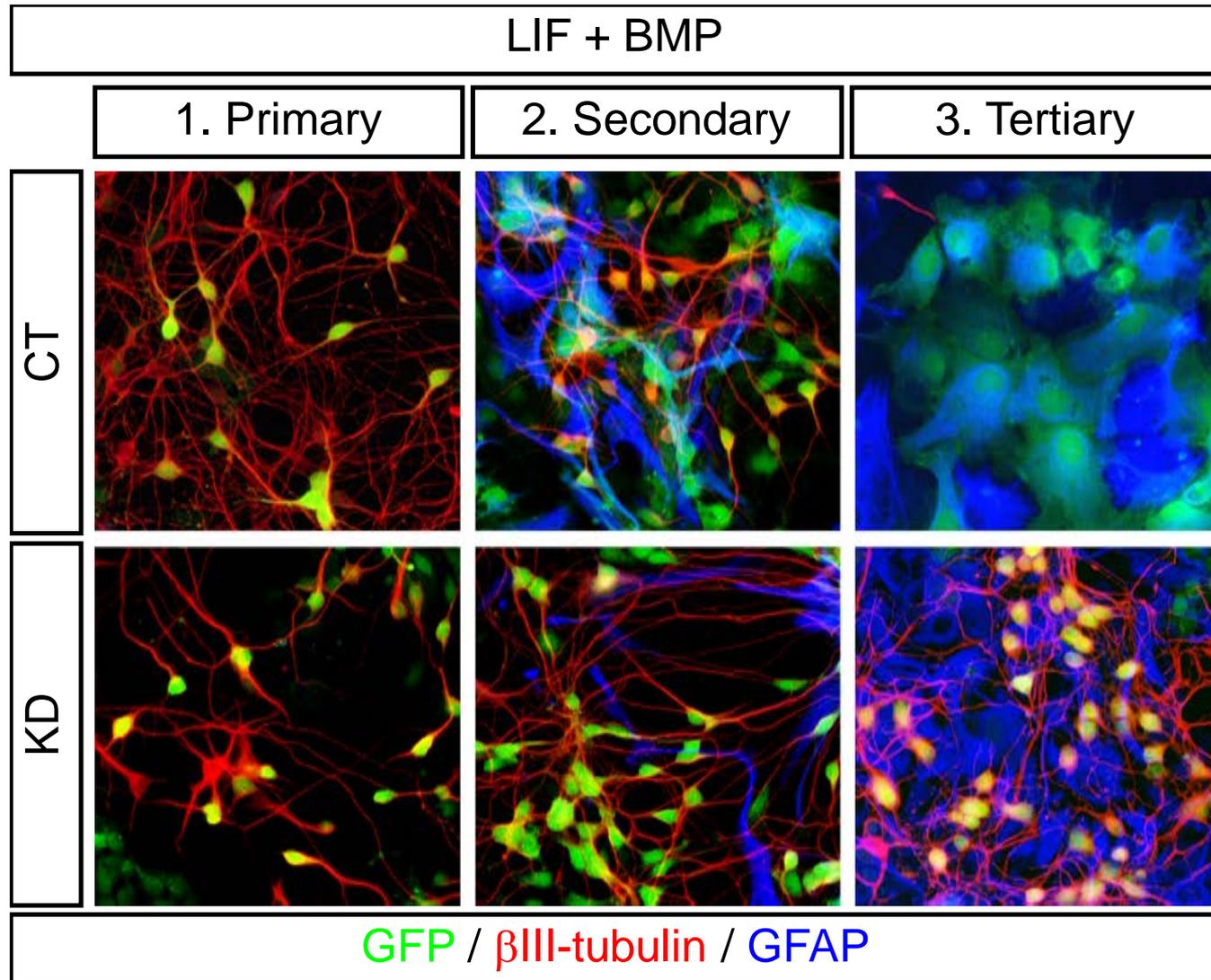
Pointer Location: 827nm, 83%

免疫染色法の工程

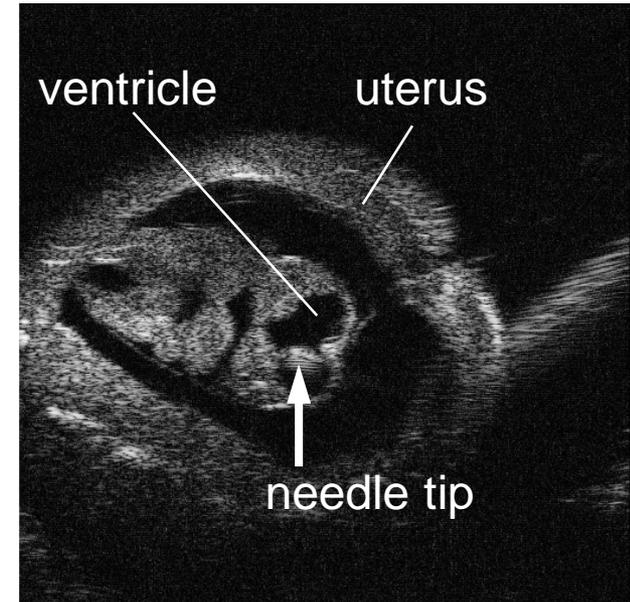
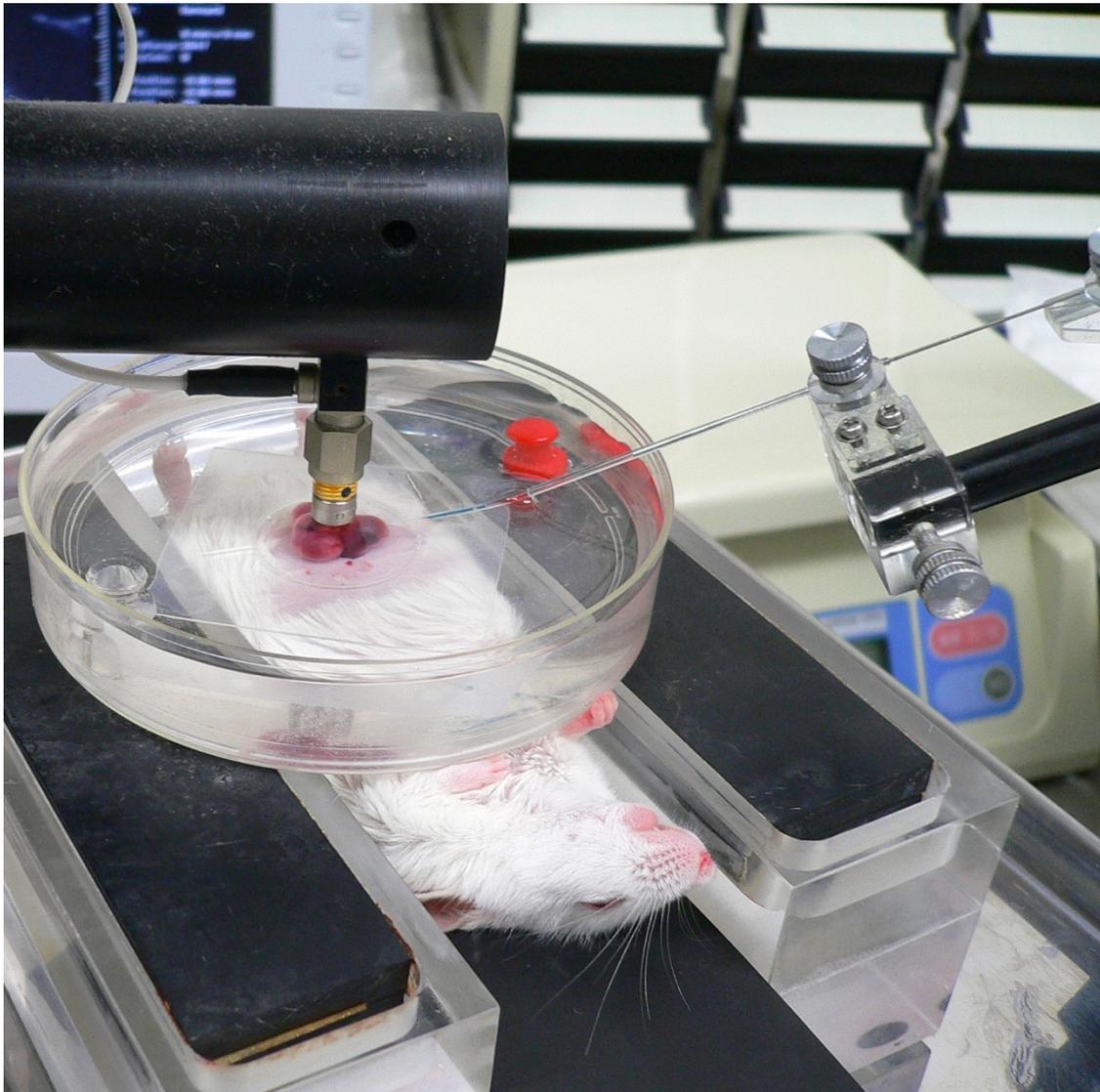


実験医学別冊 免疫染色&in situ ハイブリダイゼーション最新プロトコール

Coup-tf1はグリア誘導シグナルに 応答できるようになるのに必須である

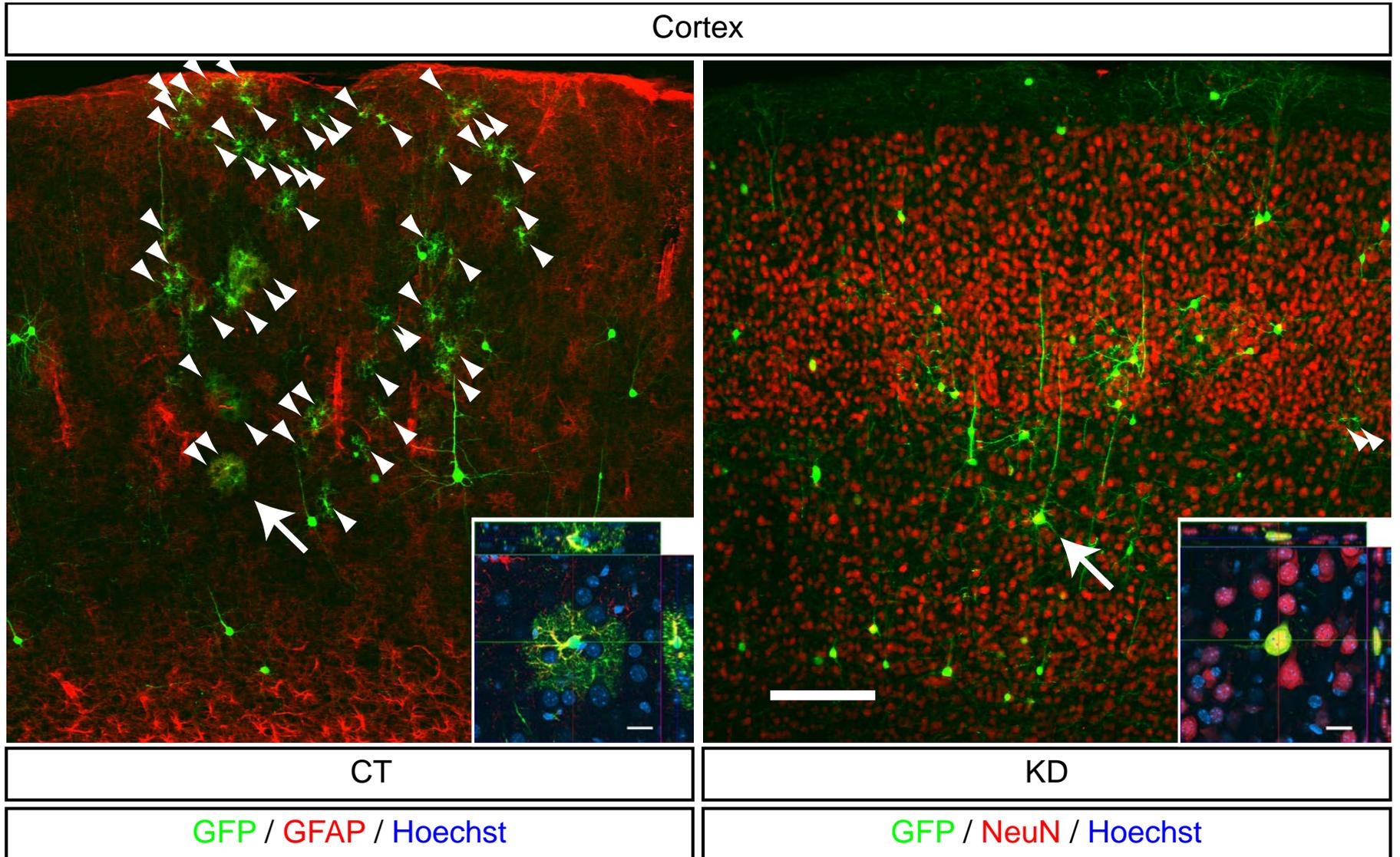


子宮内マウス胎仔脳へのLentivirusマイクロインジェクション

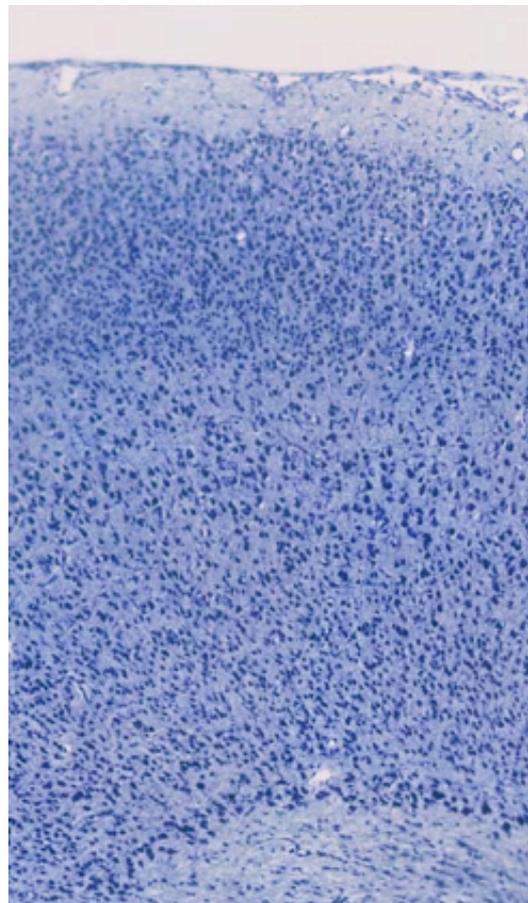


E10.5

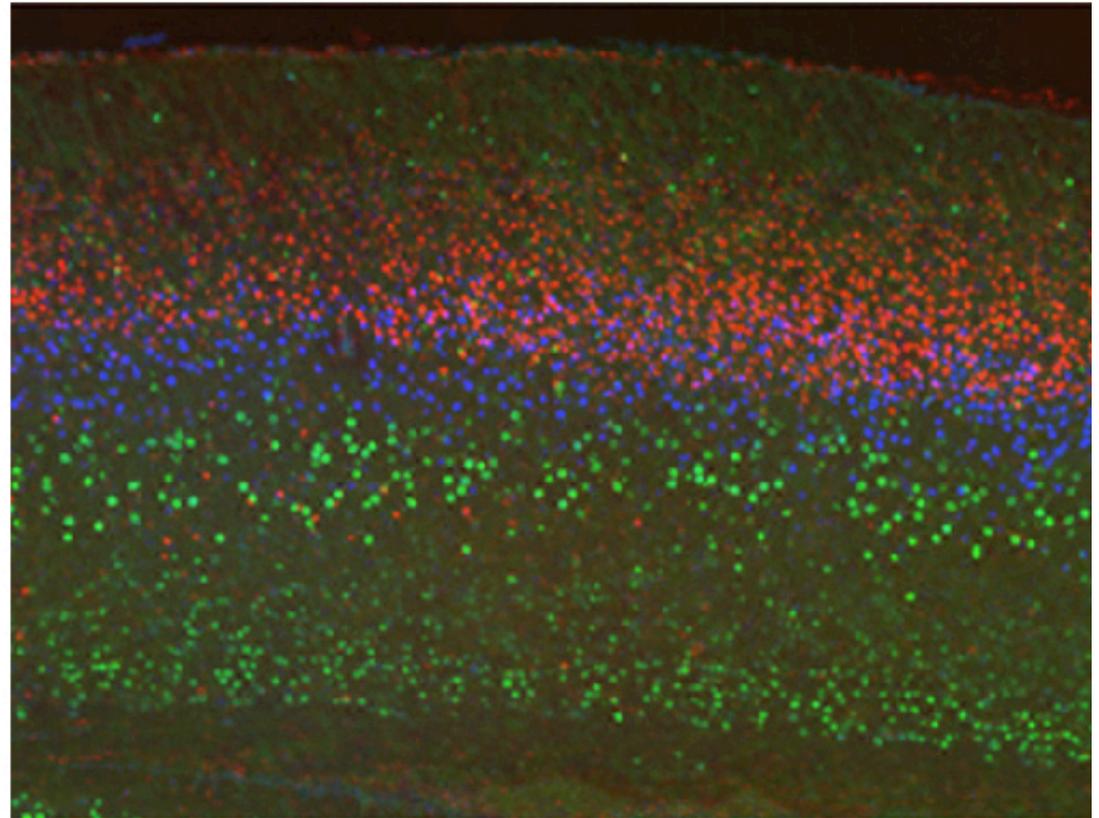
Coup-tfsの発現抑制は*in vivo*でもgliogenesisを抑制する



大脳皮質の層構造 laminar fate marker



Nissl染色



免疫蛍光組織化学染色

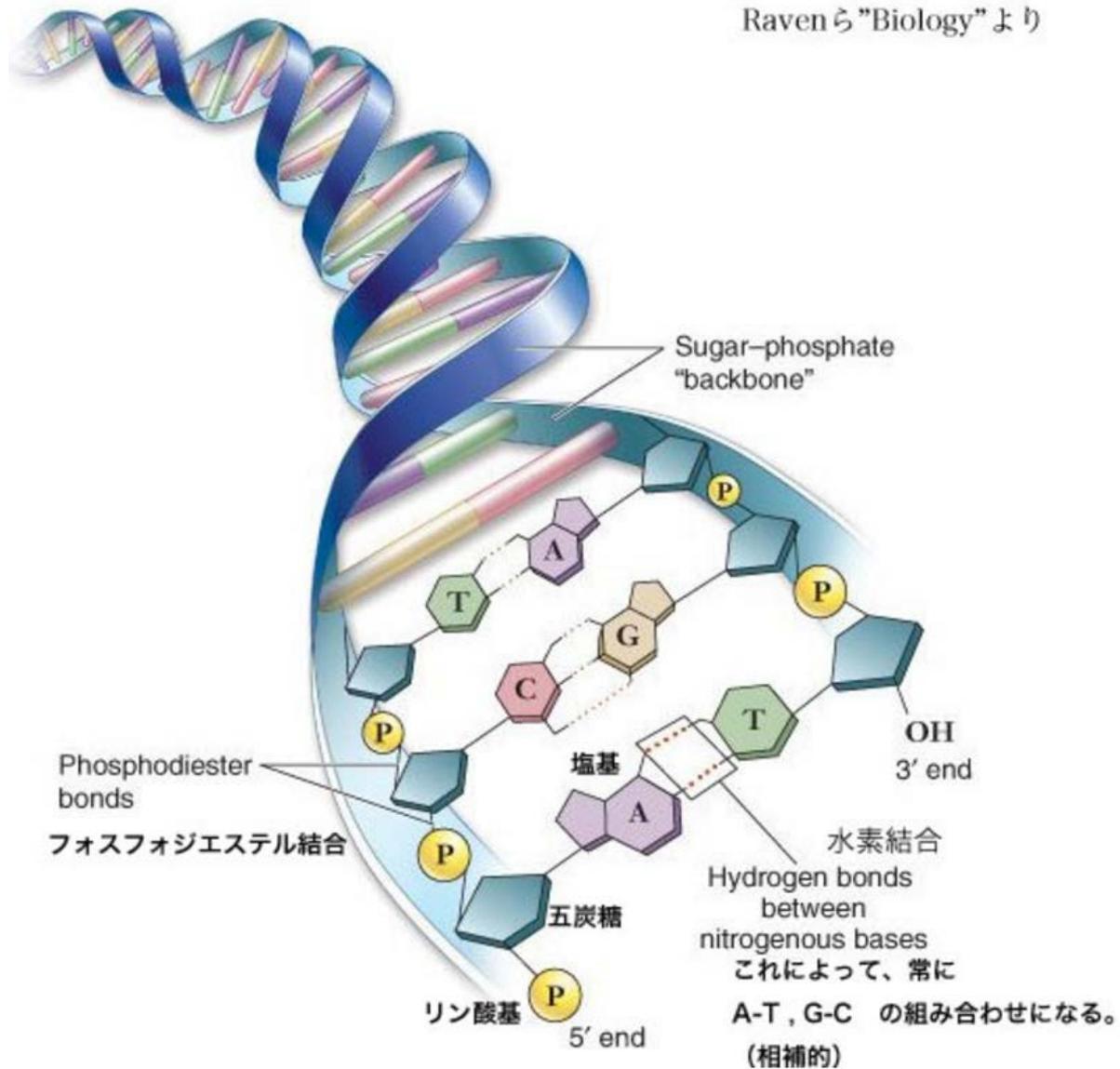
特異的な抗体を用いて、特定の分子（多くの場合タンパク質）を検出する

今回のポイント

1. 免疫細胞/組織化学法
Immunocytochemistry
Immunohistochemistry
2. *In situ* ハイブリダイゼーション法
In situ hybridization

DNA二重螺旋構造

Ravenら "Biology" より



in situ hybridization (ISH)

*in situ*ってどういう意味？

In situ 本来の場所で

In vitro 試験管内で

In vivo 生体内で

In utero 子宮内で

In silico コンピュータ（シリコンチップ）の中で

in situ hybridization (ISH)

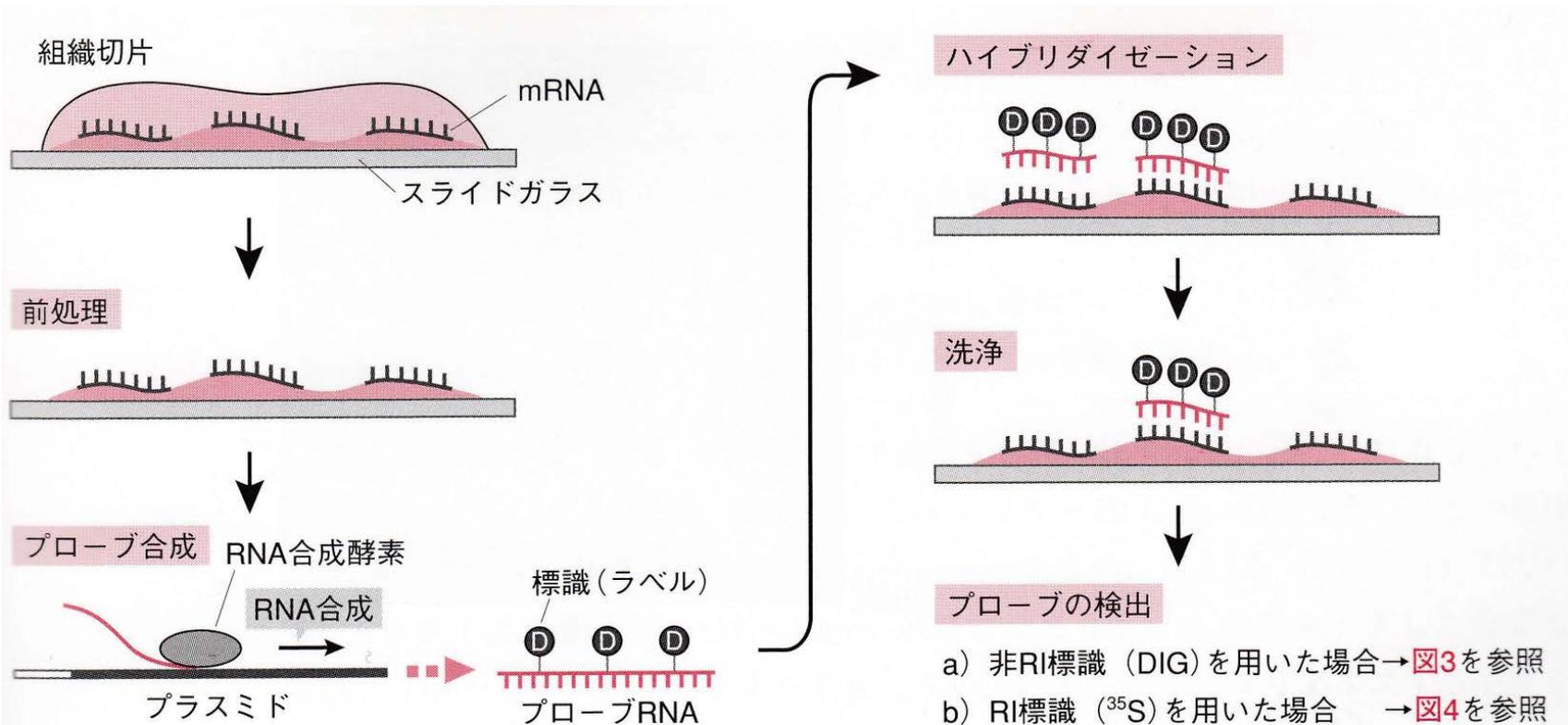
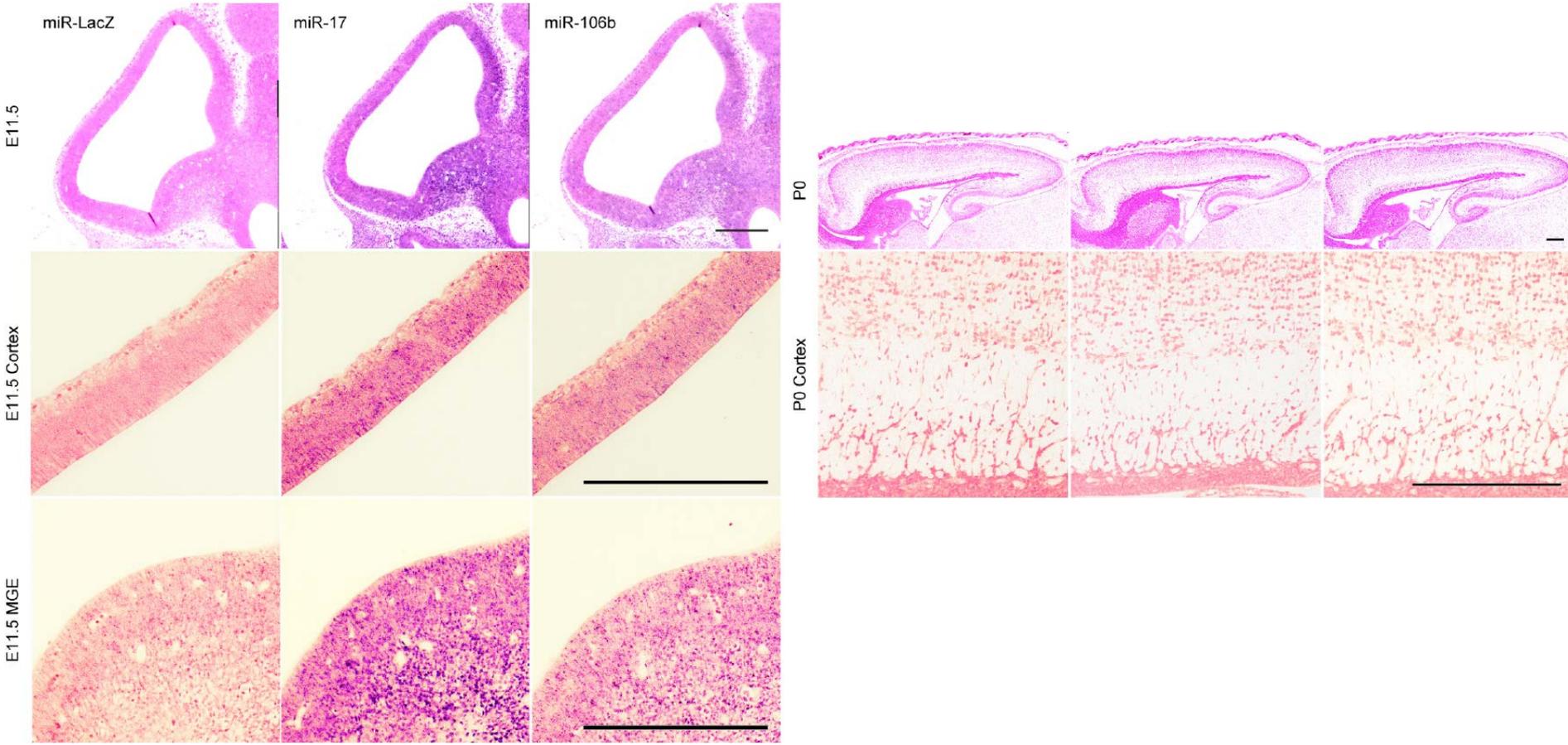


図1 *in situ* ハイブリダイゼーション法の原理

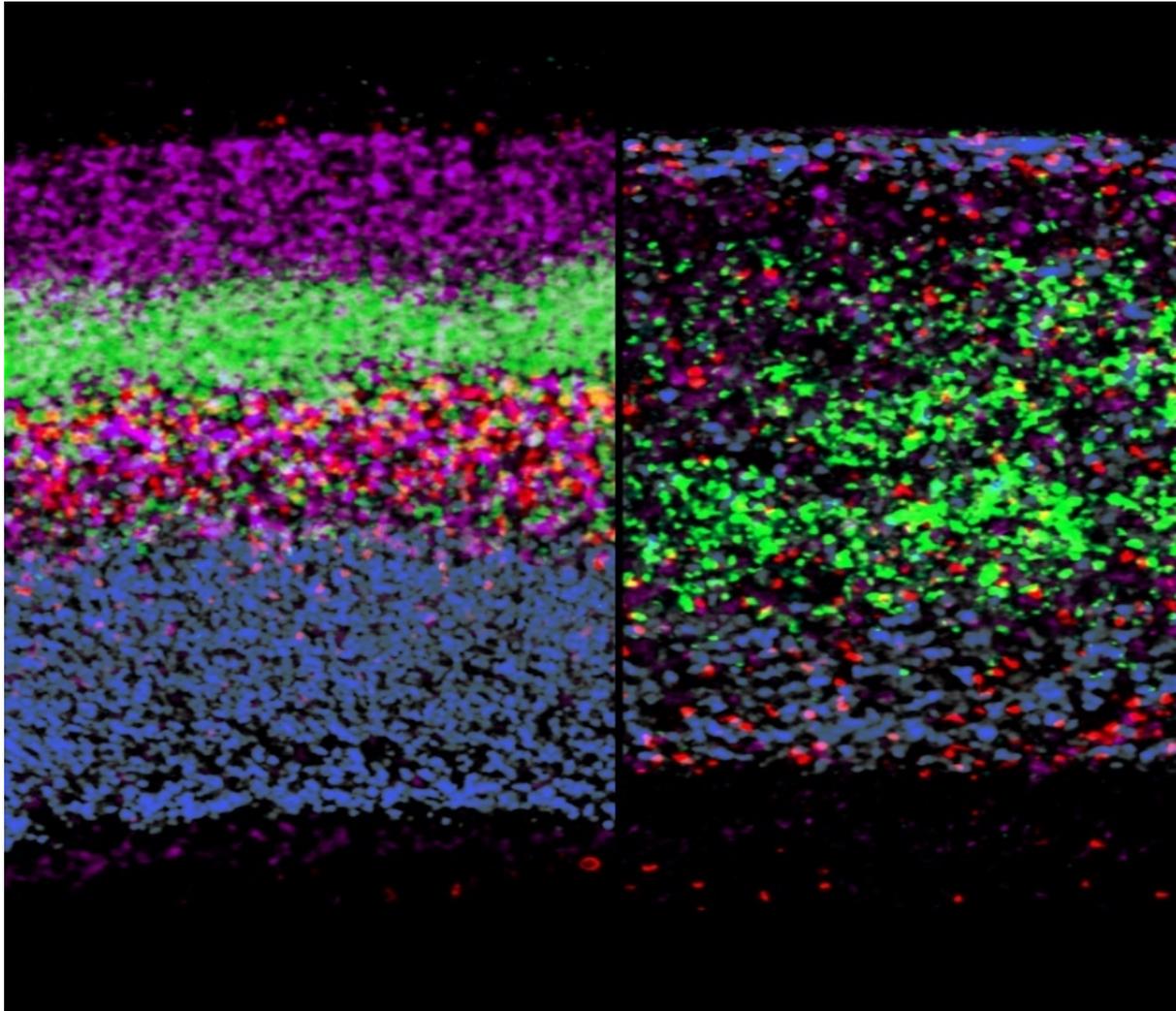
- RNAを検出するための染色法
- 抗体作製が不要

実験医学別冊 免疫染色&*in situ* ハイブリダイゼーション最新プロトコール

miR-17は発生段階が進むと発現しなくなる



Reelerマウスで脳の層構造が破綻する



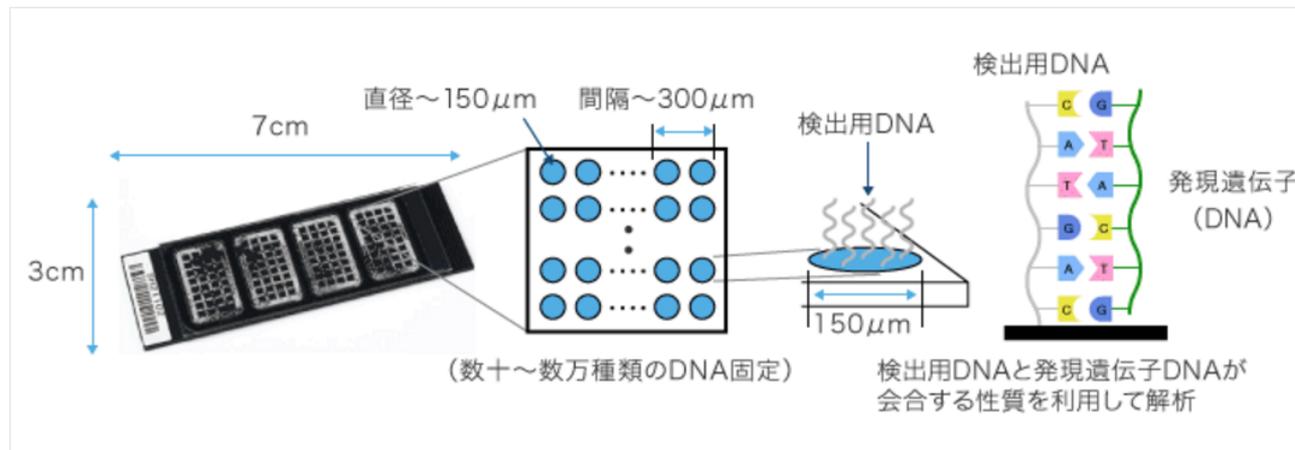
WT

Reeler マウス

おまけ: マイクロアレイ

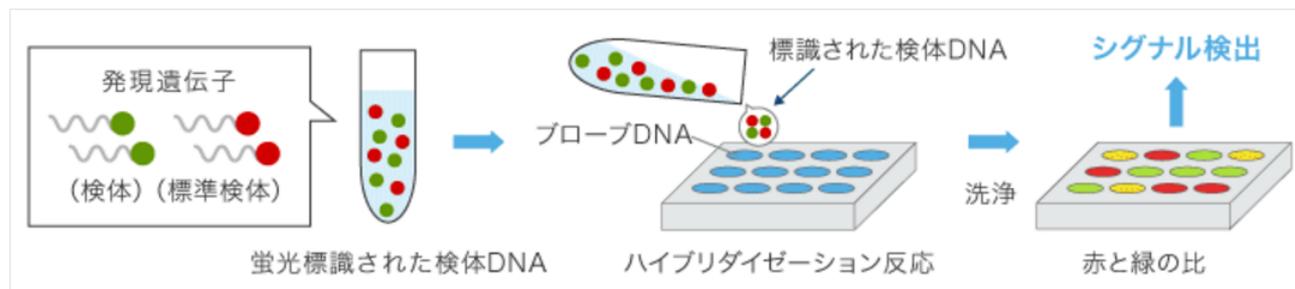
DNAチップの構造

一般的なDNAチップの構造は、数cm角の基板に多種類の既知の検出用DNAを固定配列した構造になっています。それぞれのスポット面に数十から数万種類の検出用DNAを固定しており、これと発現遺伝子DNAが会合する性質を利用して解析します。



DNAチップの使用方法

検体から抽出した遺伝子を緑、基準となる標準検体を赤の蛍光色素で標識した後、DNAチップとハイブリダイゼーション反応をさせます。反応後、洗浄したチップをスキャナーで読み取り、シグナルを検出します。反応後のシグナルの赤と緑の比を調べることで、どのような遺伝子がどの程度発現しているかを調べることができます。



今日のまとめ

1. 免疫細胞化学法と免疫組織化学法

抗原と特異的に反応する抗体を利用して、
主にタンパク質を検出する染色法

2. *In situ* ハイブリダイゼーション法

DNAやRNAが塩基配列特異的に
ハイブリダイゼーションする性質を利用して、
mRNAやmicroRNAなどのRNA（遺伝子発現）
を検出する染色法

検出には蛍光色素や酵素を結合したプローブを利用する

例題

免疫組織/細胞化学染色法は、抗原と **A** が特異的に結合することを利用し、組織切片中で目的とする物質（主に **B**）を検出する染色法である。

二次抗体に **C** が結合されているものを使用した免疫染色法を免疫蛍光染色法と呼ぶ。