

実験 D

免疫抗体染色法によるタンパク質の局在の観察

(文責：杉本亜砂子、10/2002)

<目的> 免疫抗体染色法により特定のタンパク質を可視化し、タンパク質の時期的および空間的発現パターンを調べる。

<方法> デスモソーム構成タンパク質に対するモノクローナル抗体(MH27)を用いて線虫の胚を染色し、観察する。デスモソーム(接着班)は、中間径フィラメントが裏打ちする細胞間接着装置である。線虫では上皮細胞・消化管(咽頭と腸)形成細胞に存在する。

- MH27 抗体は University of Iowa の Hybridoma Bank から購入できます。
<http://www.uiowa.edu/dshbwww/mh27.html>

<手順>

1. スライドガラスを 0.01%(v/v) poly-Lysine 溶液でコーティングする(各班 2 枚)。ヒートブロックの上にスライドガラスを載せて温め、poly-Lysine 溶液 30ul を中央部にたらし、ピペットチップの先で円状に広げる。乾いたら使用可。poly-Lysine でコーティングすることにより、試料が接着するようになる。

スライドガラスの白い部分のざらざらしている方が表。白い部分に鉛筆で班名などを書いておく。(あとで有機溶媒に浸けるので、マジック類では消えてしまうので注意。)

2. poly-Lysine が乾いて膜状になっている部分に PBS 溶液を 3ul のせる。

3. PBS 溶液の中に sem-4 変異体の成虫を数匹(5~10 匹)載せる。

sem-4 変異体は卵が産めないで、成虫内に受精卵が蓄積する いろいろな発生時期の胚を観察することができる。大きめの成虫(胚を多数持っているもの)を拾うこと。

- MH27 で染色される後期胚が多数得られる。ただし、あまり古い成虫を選ぶと、pretzel ばかりになってしまうので注意。Egl であれば sem-4 でなくても可。
4. カバーガラスを静かに載せる。実体顕微鏡で観察しながら、成虫の軀が破裂して胚が外に出てくることを確認。成虫が破裂しない場合は指で静かにカバーガラスに圧力を加えて破裂させる。
 5. 成虫が破裂したことを確認したら、すぐにドライアイスの上にスライドガラスを載せる。10 分置く。
 6. <固定> 剃刀の刃でカバーガラスをはがし、すぐに -20 に冷やしたメタノールにつける(In 染色バット)。10 分置く。
 7. -20 に冷やしたアセトンにつける。10 分置く。
 8. PBST (PBS-0.1% Triton)につける。5 分置く。PBST を交換してさらに 10 分置く。
 - 通常は、PBST の前に、90%、70%、50%、30%のアセトンシリーズにつける。学生実習用の簡便法なので省略している。
 9. <一次抗体反応> スライドの裏側、試料のない部分の水分をキムワイプでふき取る。(試料の部分に触らないように注意!!) MH27 (マウス・モノクローナル抗体) 20ul を試料の上に載せ、カバーガラスで覆う。(カバーガラスの方に抗体溶液を載せ、ピンセットで逆さまにしながらスライドガラス上の試料が載っている部分に置くとよい。)
 10. タッパー(小)に湿らせたペーパータオルを敷き、その上にスライドガラスを置く(乾燥を防ぐため)。蓋をして 37 で 45 分インキュベート。

- 通常は1時間インキュベートしている。学生実習用に短縮。

11. PBST に入れる。液に浸すとカバーガラスは自然に落ちる。室温で5分。PBST を換えてさらに10分。

12. <二次抗体反応> 試料のない部分の水分をふき取り、二次抗体(ロバ由来 Cy3 標識抗マウス抗体) 20ul を載せて、上と同様に 37 で 30 分インキュベート。

Cy3 は蛍光性化合物。

- 通常は1時間インキュベートしている。学生実習用に短縮。

13. PBST に入れる。5分したら PBST を交換してさらに10分。

14. 試料のない部分の水分をふき取り、DAPI mounting medium をカバーガラスに 3ul 程度のせ、逆さまにしながら静かに試料の上に載せる。余分な水分はキムワイプでふき取って、マニキュアでカバーガラスのまわりをシールする。

15. 蛍光顕微鏡で観察する。抗体染色は緑励起で赤色の蛍光として観察できる。DAPI (UV 励起、青蛍光) もフィルターを交換することにより見ることができる。

<課題>

1) 胚発生のどの時期からシグナルが観察できるか。

2) 上皮細胞(表皮)の形は発生が進むにつれてどのように変化していくか。

- *C. elegans* の胚発生過程は別途説明。形態形成は細胞分裂が停止したあとにおこることなど。
- 自分で焦点を変えながら観察して、下皮のパターニング、消化管の構造などをスケッチ。
- 形態形成期の各ステージ (lima bean, comma, 1.5-fold...) を観察。