

【今更聞けない、、、抗体のタイトレーションとは????】

第3回目の今更聞けない、、、は、抗体のタイトレーションについてお話しようと思います。

細胞を染色する抗体セット（パネル）の選定も終わり（第2回目参照）、あとは実験するだけ！と思いきや、次に考えるべきは、細胞染色時に適切な抗体量の検討（タイトレーション）です。

なぜ抗体量の検討が必要なのでしょう？

蛍光強度を正しく測定するためには、バックグラウンドノイズをできる限り減らし、陽性細胞の蛍光強度を最大化する必要があります。抗体量を検討することで、抗体が細胞へ非特異的に結合する量をできるだけ減らすことができます。

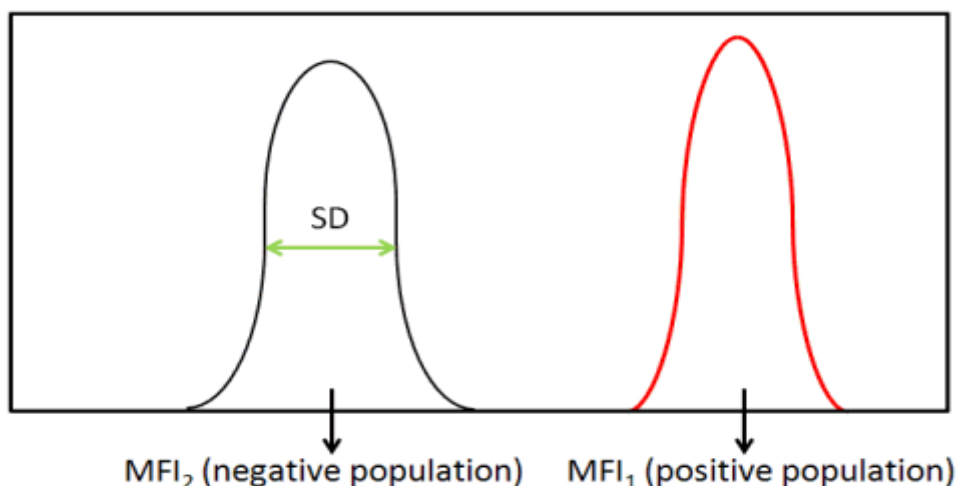
■ 抗体の非特異的結合

細胞に対して、抗体量が適切な場合は、抗体はアフィニティの高いエピトープ（抗原認識部位）へ結合します。しかし、抗原に十分量の抗体が結合し、それでも過度の抗体が残っている場合、抗体はアフィニティの低いターゲットへ結合してしまいます（オフターゲット効果）。

抗体はFc受容体を介したFc結合や、細胞表面のたんぱく質への非特異的結合（死細胞でよくおこる）、また特定の細胞（単球やマクロファージなど）がシアニンなどの蛍光色素と結合してしまう現象など、エピトープへの結合以外でも細胞表面に結合することがあります。

■適切な抗体量の計算方法

様々な抗体量で染色を検討しても、どの抗体量が一番適切かを検討するためには、各抗体量の染色データから、Stain Index (SI) を計算します。Stain Index とは、（陽性細胞の蛍光強度の中央値）から（陰性細胞の蛍光強度の中央値）を引いて、それを 2 倍の陰性細胞の蛍光強度の SD で割った値のことを指します。



$$\text{Stain Index} = \frac{[\text{MFI}_1 - \text{MFI}_2]}{2 \times \text{SD}}$$

Stain Index の値が大きければ大きいほど、陽性細胞と陰性細胞の蛍光強度の差が大きく、細胞集団のばらけ方が少ない、ということを意味します。この SI が最大になるような抗体量が、染色時の適切な抗体濃度ということになります。

■ Stain Index について

<https://www.biolegend.com/newsdetail/1245/>

■ 抗体の非特異的結合を防ぐためのバッファー紹介

http://www.digital-biology.co.jp/allianced/products/biolegend/docs/A4_07-0126-02i_BufferSolution_web.pdf

■ 過去の記事はこちらからどうぞ

[第 1 回：今更聞けない、、、CD 抗原とは？？？？](#)

[第 2 回：今更聞けない、、、マルチカラーパネルとは？？？？](#)