

【今更聞けない、、、サンプルを固定したときの FCM 測定】

フローサイトメトリー実験に関する、今更聞けない質問にお答えする「今更聞けない、、、」ですが、今回はパラホルムアルデヒドなどで細胞を固定時のフローサイトメトリー実験に関してお話しさせていただきます。

■ 固定時のバッファー

「細胞固定」と一口に言っても、使用するバッファーや成分濃度はまちまちです。

もっとも一般的な固定剤の一つはパラホルムアルデヒド（PFA）ですが、例えば、感染性のサンプルを消毒することが目的である場合には、0.37%ほどの低濃度で HIV 感染患者のサンプルを効果的に消毒することが可能です

(<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0022175986902784>)。

サイトカインなどの細胞内因子を測定する目的で細胞を固定したい場合には、1% PFA で 45~60 分程度、4% PFA で 15~20 分ほどインキュベーションすることで完全に固定されます。

■ 固定が先か、染色が先か

細胞固定時のフローサイトメトリー実験プロトコルの検討時によくお問い合わせいただく質問の一つが「細胞固定してから、抗体で染色すべきなのか」「抗体で染色してから、細胞固定すべきか」という問いです。

この問題に関しては、実は絶対的な回答はありません。

考慮すべきなのは、

1. 固定によって、抗原（正確には抗体のエピトープ）が変性するか？
2. 使用する固定剤に蛍光色素が耐えられるか？

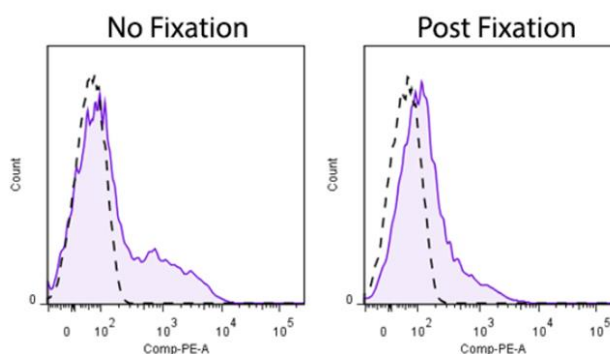
という 2 点です。

1. 固定によって、抗原（正確には抗体のエピトープ）が変性するか？

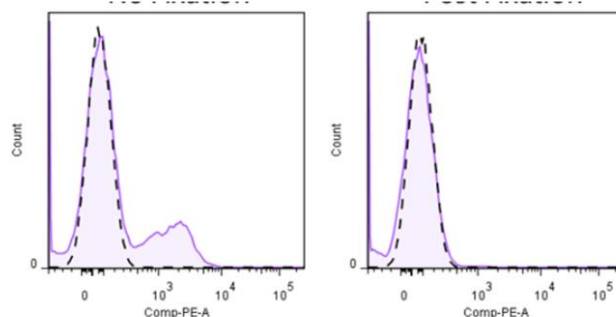
固定液にさらすことで抗原エピトープの構造が変化し、抗体が標識である抗原に結合できなくなる可能性があります。

以下は、その一例です。固定前の細胞と固定後の細胞を同じ抗体で染色し、フローサイトメトリーで測定しています。細胞を固定することで抗原エピトープが変性し、抗体が結合できなくなり、結果として蛍光シグナルが失われています。

Anti-human PD-1(CD279)
Clone EH12.2H7



Anti-mouse IL-7Rα(CD127)
Clone A7R34



この現象が起こるかどうかは、抗体のクローンによって異なるため、使用予定の抗体クローンごとの情報を収集しておく必要があります。

BioLegend 社では、4% PFA 固定時に各クローンの抗体が固定前と同様、抗原に結合できるかを確認したデータを公開しています (<https://www.biolegend.com/en-us/fixation>)。

2. 使用する固定剤に蛍光色素が耐えられるか？

抗体に結合している蛍光色素の中には、固定剤による影響を受け、蛍光シグナルの一部が失われてしまうものがあります。APC や PE などのタンパク質ベースの色素、特にそれらのタンデム色素は影響を受けやすいため、固定をする場合、合成化合物系の色素 (AlexaFluor® や BrilliantViolet™ (より具体的には BV421™ や BV510™)) を選択することがおすすめです。

どうしても固定前にタンデム色素標識抗体で染色をしたい場合には、タンデム色素への負担を軽くした固定用バッファー FluoroFix™ Buffer (製品番号 : [422101](#)) のご用意がおすすめです。

上記 2 項目を考慮し、実験プロトコルを決定することで実験の失敗を小さくすることができます。

■「今更聞けない、、、」シリーズ お題大募集中■

フローサイトメトリー実験についての「今更聞けない、、、」なことを大募集しています。

TDB News に採用された方にはオリジナル USB メモリーをプレゼントします。

お題お申込み、過去の記事は[こちら](#)からご確認ください。

TDB News 4.2022

トミーデジタルバイオロジー株式会社

Phone 03-6240-0843 Fax 03-6240-0461