

抗体標識用色素の選択と組み合わせについて

はじめに

フローサイトメトリーにおけるマルチカラー解析は、機器の発達、多様な抗体試薬の発売に伴い、より実験しやすくなってきました。マルチカラー解析は、時間、抗体試薬、サンプルを節約することになります。その反面、マルチカラー解析が成功するかどうかは、その抗体を標識する蛍光色素が大きく影響します。このTechnical Informationでは蛍光色素の選択に必要ないろいろなファクターを解説します。

蛍光色素の選択に必要なファクター

相対蛍光強度

各蛍光色素は相対蛍光強度が異なります。使用する抗体のネガティブ、ポジティブを見分ける能力(S/N比: ポジティブのとネガティブの蛍光強度の比率)はどの蛍光色素に標識されているかにより異なります。図1は異なる8つの蛍光色素を標識したCD4モノクロナル抗体で染色したパターンです。この図から、使用したモノクロナル抗体のS/N比が、蛍光強度により異なっているのがわかります。

また、相対蛍光強度は機器によって異なります。これは、機器によってレーザーとフィルターの組み合わせが異なることによります(図2)。

抗原密度

発現が多い抗原はどのような色素でも使用することが可能です。発現の密度が低い抗原は高いS/N比が必要とされ、PEやAPC標識などが適しています。

相対蛍光強度と抗原密度により、次のように用途を考えることができます。相対的に明るい蛍光色素は、「低密度に発現している抗原」「自家蛍光が高い細胞」「細胞内抗原」などに使うことができます。相対的に暗い蛍光色素は、「高密度に発現している抗原」「陽性細胞が多い抗原」「Lineage抗原」などに使用するべきです。

BD Biosciences

Clontech
Discovery Labware
Immunocytometry Systems
Pharmingen



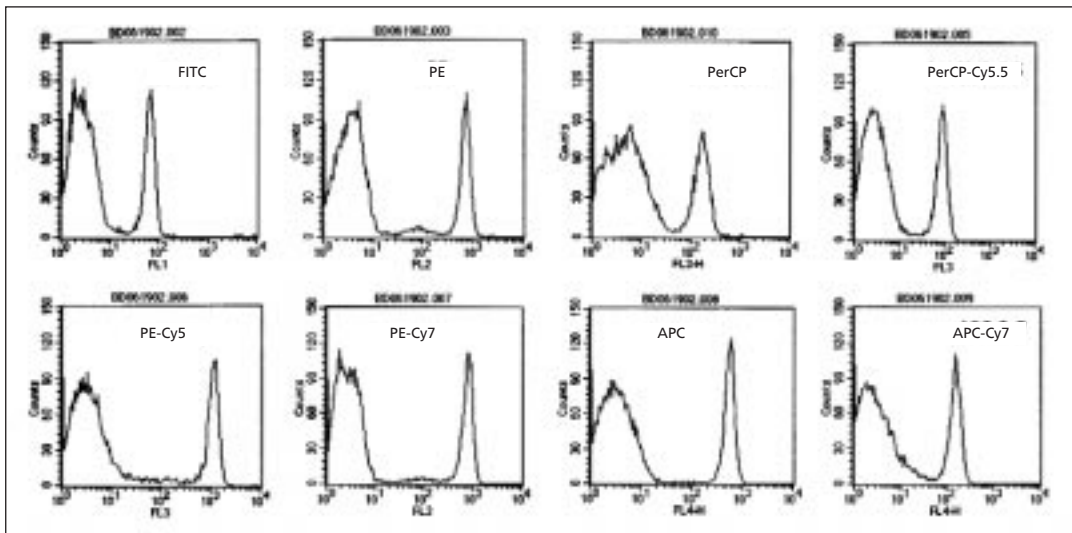


図1 CD4抗体の標識色素の違いによるBD FACS Vantage™のシグナル/ノイズ(S/N)比

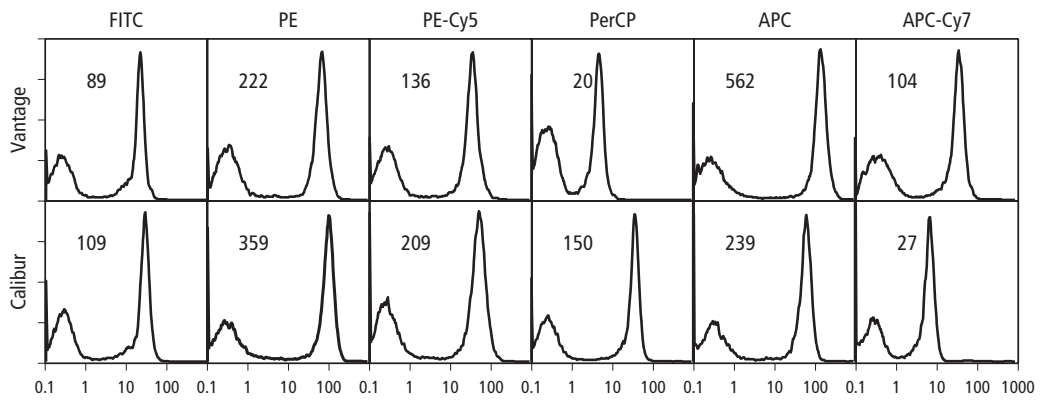


図2 BD FACSCalibur™とBD FACS Vantage™の蛍光強度の違い

F/P比

抗体を標識する蛍光色素の数(F/P比)は相対的な強度に影響します。FITCとPerCPは抗体に対して1:2~9の割合いで結合します。この比率は抗体により異なります。PEとAPCは、抗体に対してほとんどが1:1の割合で結合します。

PE-Cy7やAPC-Cy7などのタンデム色素*の場合は、PEとAPCは抗体に対して約1:1の割合で結合しますが、Cy7分子はPEやAPC 1分子に対して複数分子が結合します。別のタンデム色素PerCP-Cy5.5の場合はPerCP 1分子に対しCy5.5 1分子が結合しています。

標識の特性によりIgM抗体の場合は、FITC、Texas Red、Cy3、またはCy5などの小さな分子量の蛍光色素とのみ標識できます。

蛍光色素の非特異的結合

多くの標識された抗体が低レベルながら非特異的結合を呈し、ネガティブ細胞の蛍光を自家蛍光以上のレベルにまで増強させます。この非特異的結合は、特に次のことにより引き起こされます。

IgGアイソタイプの中には、いくつかの種類の細胞に存在するFcレセプターに結合しやすい性質をもつものがあります。

蛍光色素にもいくつかの種類の細胞へ結合しやすいものがあります。Carbocyanin色素(Cy3、Cy5、Cy5.5、Cy7)およびTexas Redで直接的に抗体に標識されたものや、タンデム色素標識の一部はその傾向があります。Cy5はFcレセプターに低い親和性をもち、PE-Cy5タンデム色素も同様な特性があります。Cy5.5もFcレセプターに低い親和性をもちますが、PerCP-Cy5.5タンデム色素は同様な特性をもっていません。

レーザー

1つのレーザーの仕様で使用できる蛍光色素が、2つ以上のレーザーを使用する場合でも使用できるとは限りません。ある蛍光色素が2つのレーザーにより励起されることにより、蛍光コンベンションを行なうことが必要になることがあります。また同じ波長のレーザーでも使用する機器によりその出力が異なり、蛍光強度特性が変わる場合があります。

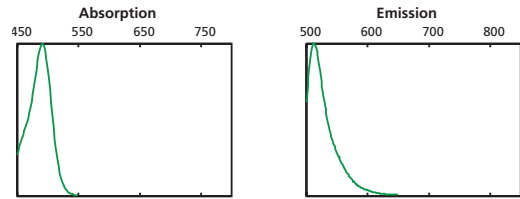
*タンデム色素

PE-Cy5、PE-Cy7、PE-TR、PerCP-Cy5.5、APC-Cy7などが該当します。2つの蛍光タンパクがカップリングした色素で、1つがレーザー光を吸収し、もう片方の色素にそのエネルギーを伝達します。PE-Cy5の場合、488 nmのレーザーの吸収をPEが行ない、Cy5がそのエネルギーを受け取り、Cy5の蛍光特性により蛍光を発します。

通常はレーザー光を受け取る蛍光色素そのものより明るくなります。潜在的に蛍光波長がわずかに変動する可能性があり、またロットごとに蛍光オーバーラップが異なります。2本以上のレーザーを使用する場合、2本目以降のレーザーで励起されないかどうか確認する必要があります。

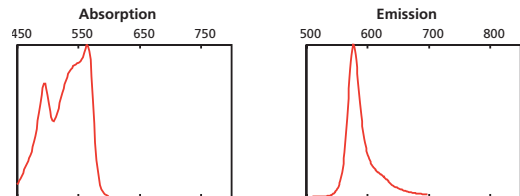
FITC : Fluorescein isothiocyanate

広く使われる色素の1つです。分子量が小さく(389 MW) 標識させやすく、標識が安定しています。蛍光強度は相対的には低くなりますが、色素そのものの非特異結合が少ないので、ポジティブとネガティブの分離は明確になります。



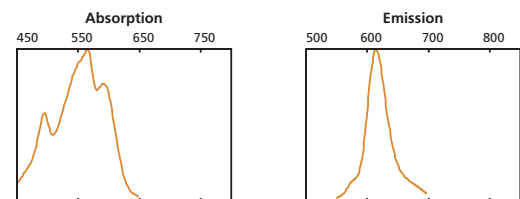
PE : Phycoerythrin

明るく、バックグラウンドが低く、標識が安定で、ほとんど欠点のない色素です。抗体と1:1で結合させることもできます。分子量は大きく220,000 MWです。



PE-TR : PE-TexasRed

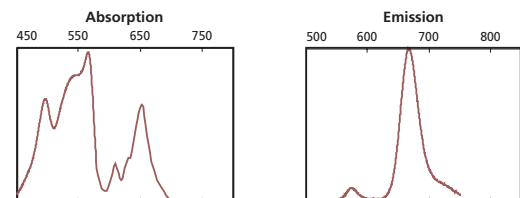
BD FACSVantage™、BD FACSDiVa™ Optionにおいては、FITC、PEとともに使用できる色素です。HeNeレーザー、赤色半導体レーザーによりほとんど励起されないため、これらのレーザーとの併用も可能です。ただし、蛍光強度が 10^3 以上になるような強発現の抗原の場合には、APC用検出器に若干の蛍光オーバーラップが生じる可能性があります。BD FACSCalibur™ においては適したフィルターがセットされていないので使用は難しいでしょう。



欠点として、PEとの大きな蛍光オーバーラップがあります。抗体試薬のロットごとに蛍光コンペーションの値が異なるので、予めテストすることが必要です。マクロファージではわずかに高いバックグラウンドが見られます。

PE-Cy5 : PE-Cyanin 5(商品名: Cy-Chrome)

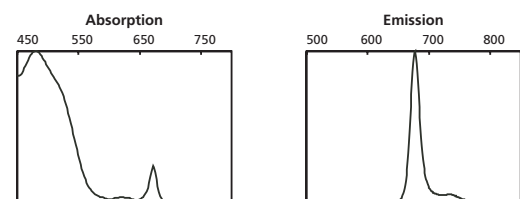
非常に明るい蛍光色素で、シングルレーザー仕様においてはFITC、PEとともに使用できる第3の色素として有用です。PE-Texas Red(Red613)と比較するとPEとの蛍光オーバーラップは少量で蛍光コンペーションによって補正が可能です。



欠点として、色素を構成するCy5はB細胞やマクロファージのFcレセプターに非特異的に結合することが挙げられます。この現象は、バックグラウンドを最小限にするために抗体の最低使用量をテストするか、Fcブロックを使用して非特異的結合を阻害することで、ある程度防ぐことができます。抗体試薬のロットごとに蛍光コンペーションの値が異なるので、予めテストすることが必要です。また、HeNeレーザー、赤色半導体レーザーにより励起されるため、レーザー間の蛍光補正機能がない場合はAPC、APC-Cy7との併用は推奨しません。

PerCP : Peridinin Chlorophyll Protein

PecCPIはPE-Cy5に代わる色素として開発されました。バックグラウンドレベルが低く、PE検出器への蛍光オーバーラップがほとんどありません。HeNeレーザー、赤色半導体レーザーによる励起もほとんどないのでAPC検出器への蛍光オーバーラップもわずかです。したがって、BD FACSCalibur™ においては3カラー、4カラー解析のための3色めとして使いやすい色素です。



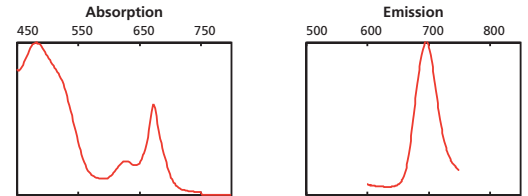
欠点として、相対蛍光強度が暗いことが挙げられます。そこで、抗原密度の少ない表面抗原や細胞内タンパクに対する標識抗体の製品は限られています。PerCPはBD FACSVantage™ SE、BD FACSDiVa™ Option では、使用しているレーザーの出力がBD FACSCalibur™ に比べて強く、色素分子がフォトブリーチの影響を受けるため、蛍光強度が弱くなるので使用することは推奨しません。

PerCP-Cy5.5: Peridinin Chlorophyll Protein-Cyanin 5.5

PerCP-Cy5.5はPerCPの蛍光強度をより改善したタンデム色素です。Fcレセプターをもつマクロファージにおいてもバックグラウンドレベルが低く、PE検出器への蛍光オーバーラップはPerCPと同様にほとんどありません。HeNeレーザー、赤色半導体レーザーによる励起もほとんどないのでAPC検出器への蛍光オーバーラップもわずかです。従って、BD FACSCalibur™ においては3カラー、4カラー解析のための3色めとしてPerCPより使いやすい色素となります。

BD FACSVantage™ SEにおいても、色素分子がフォトブリーチの影響を受けず使用可能で、FITC程度の蛍光強度を得ることができます。BD FACSVantage™ SEにおいてはシングルレーザーで、FITC、PE、PE-Texas Red、PerCP-Cy5.5という4カラーの選択も可能になります。APC、APC-Cy7と併用する場合は、PerCP-Cy5.5はHeNeレーザーにより若干励起されますので、BD FACSVantage™ SEにおいてレーザー間の蛍光補正ができるBD FACSDiVa™ Option等が必要となります。

欠点としては、タンデム色素としての一般的で潜在的な現象として、ロットごとに蛍光オーバーラップが異なるので、予めテストすることが必要です。

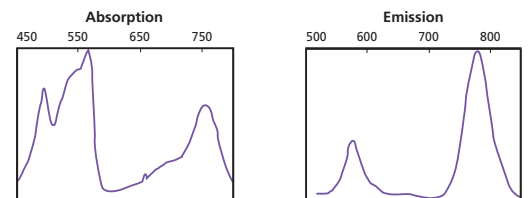


PE-Cy7 : PE-Cyanin 7

PE-Cy7は相対的に明るいタンデム色素です。488 nmレーザーによるPE検出器へのオーバーラップと、HeNeレーザーおよび赤色半導体レーザーによるAPC検出器へのオーバーラップがわずかに認められます。BD FACSCalibur™ においては、蛍光コンペンセーション調整が可能です。

BD FACSVantage™ SEにおいてはシングルレーザーで、FITC、PE、PerCP-Cy5.5、PE-Cy7という4カラーの選択も可能になります。APC、APC-Cy7と併用する場合は、PE-Cy7はHeNeレーザーにより若干励起されますので、BD FACSVantage™ SEにおいてレーザー間の蛍光補正ができるBD FACSDiVa™ Option等が必要となります。

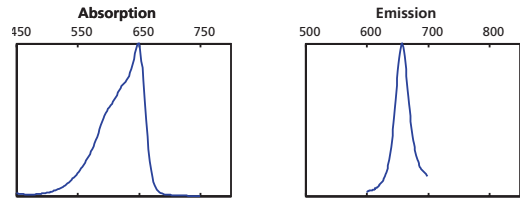
欠点としては、タンデム色素としての一般的で潜在的な現象として、ロットごとに蛍光オーバーラップが異なるので、予めテストすることが必要です。



APC: Allophycocyanin

明るく、バックグラウンドも少ない色素です。この波長域に細胞の自家蛍光が強くないということも利点として挙げられます。488 nmレーザーによる励起はわずかに認められます。

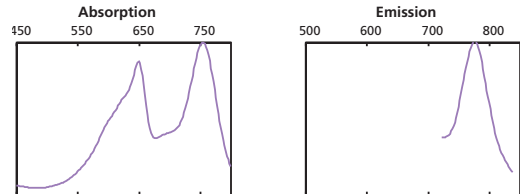
欠点として、潜在的にロットごとに蛍光オーバーラップが異なることがありますので、予めテストすることが必要です。分子量は大きく、120,000 MWです。



APC-Cy7 (PharRed)

APC-Cy7は、BD FACSVantage™ SE、BD FACSDiva™で搭載できるHeNeレーザー励起の色素として、APCと併用できる色素です。488 nmレーザーによる励起はわずかに認められます。BD FACSCalibur™では適切なフィルターがセットされていないので使用できません。

欠点としては、APCに比べて暗く、FITCと同等の強度です。潜在的にロットごとに蛍光オーバーラップが異なることがありますので、予めテストすることが必要です。



蛍光オーバーラップ

FL2へのオーバーラップ

488レーザーで励起され、650以上の蛍光を発する色素はPE-Cy5、PerCP、PerCP-Cy5.5、PE-Cy7があります。"各色素の特徴"でも説明しましたが、FL2へのオーバーラップが異なります。図4には、BD FACSCalibur™を使用しこれら4つの色素をFL3で検出した場合の、FL3 vs FL2プロットを示しました。蛍光コンペーンセーションはFL2-FL3 = 0%に設定しています。PerCP、PerCP-Cy5.5ではFL2へのオーバーラップが見られません。PE-Cy5、PerCP、PE-Cy7はFL2へのオーバーラップが見られますが、この程度であれば、蛍光コンペーンセーションにより調整が可能です。

従って、シングルレーザーにおいて、FITCとPEと併用する第3の色素の選択としては、低密度に発現している抗原の場合には、PE-Cy5またはPE-Cy7を使用することも可能ですが、高密度に発現している抗原であれば、コンペーンセーションが不要なPerCPまたはPerCP-Cy5.5を選択するほうが良いでしょう。予め、発現密度を考慮し色素の割り当てをデザインすることは必要です。

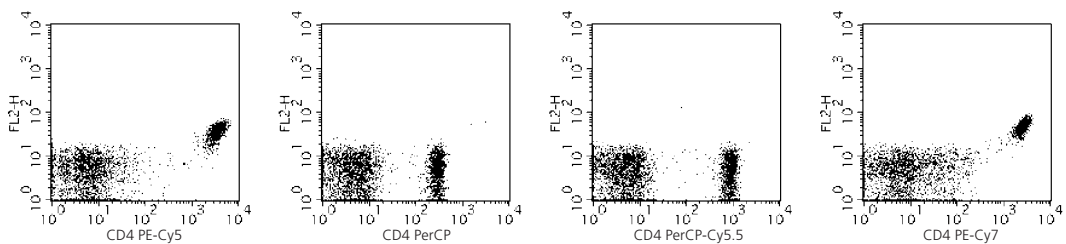


図4 PE-Cy5、PerCP、PerCP-Cy5.5、PE-Cy7のFL2へのオーバーラップ

FL2-%FL3を0%にし、各色素のオーバーラップを比較した。PerCP、PerCP-Cy5.5はFL2検出器へのオーバーラップは認められなかった。PE-Cy5、PE-Cy7ではオーバーラップが認められるが、コンペーンセーションを適正にすると、PE-Cy5の場合はFL2-%FL3は2.1%、PE-Cy7の場合はFL2-%FL3は2.9%となった。[CD4 Cy-Chrome(BD カタログ番号: 556809) CD4 PerCP(BD カタログ番号: 347324) CD4 PerCP-Cy5.5(BD カタログ番号: 341654) CD4 PE-Cy7(BD カタログ番号: 348789)]

FL4へのオーバーラップ

図5は、同じ実験で4つの色素をFL3で検出した場合の、FL3 vs FL4プロットを示しました。蛍光コンペーンションはFL4-FL3 = 0%に設定しています。PerCP、PerCP-Cy5.5、PE-Cy7ではFL2へのもれ込みがわずかに見られますが、この程度であれば、蛍光コンペーンションにより調整が可能です。PE-Cy5はFL2へのもれ込みが大きいのがわかります。

従って、HeNeレーザーまたは赤色半導体レーザーにより励起される色素(APC、APC-Cy7等)と併用する場合におけるPE-Cy5、PerCP、PerCP-Cy5.5、PE-Cy7の選択方法は次のように考えられます。まず、PE-Cy5色素はAPC検出器へのもれ込みが多く、推奨できません。BD FACSCalibur™ においては、機器により蛍光コンペーンションができますので、PerCP、PerCP-Cy5.5、PE-Cy7は可能です。BD FACSVantage™ SEにおいても、PE-Cy5以外の色素は使用できますが、レーザー間の蛍光補正ができるBD FACSDiVa™ Option等が必要となります。

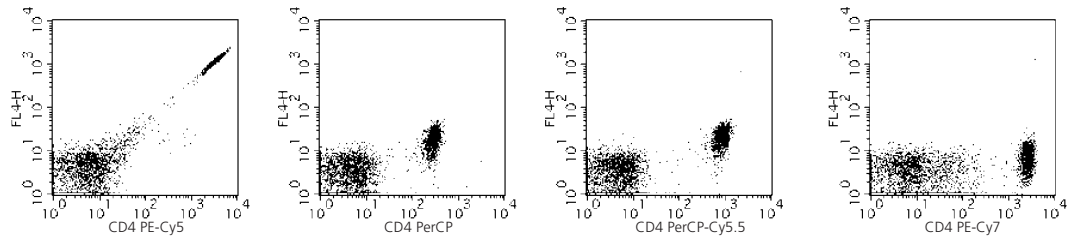


図5 PE-Cy5、PerCP、PerCP-Cy5.5、PE-Cy7のFL4へのオーバーラップ

FL4-%FL3を0%にし、各色素のオーバーラップを比較した。PerCP、PerCP-Cy5.5、PE-Cy7はFL4検出器へのオーバーラップはわずかに認められた。コンペーンションを適正にすると、PerCPの場合はFL4-%FL3は8.7%、PerCP-Cy5.5の場合はFL4-%FL3は3.5%、PE-Cy7の場合はFL2-%FL3は0.4%となった。PE-Cy5はFL4へのオーバーラップが大きく認められる。コンペーンションを適正にするためには、FL4-%FL3は56.6%の補正が必要であった。コンペーンション%は実験に使用する細胞の自家蛍光レベル、Clone、F:P比などにより異なることが考えられます。PE-Cy5をAPC、APC-Cy7と併用する場合は予めコンペーンションで調整が可能かどうか実験するほうが良いでしょう。

まとめ

マルチカラー解析をすることにより、複数の表面抗原によるフェノタイピングができ、細胞集団をより詳細にクラスター分析することができます。また、最近では表面抗原に限らず、細胞内抗原のFACSによる解析も行なわれるようになりました。今後、細胞内タンパクの構造が明らかになるにつれ、その存在の有無だけでなく、その役割を明らかにすることが必要になるでしょう。BDが提供するFACS解析のためのApoptosis検出試薬、細胞内サイトカイン染色用抗体試薬、細胞内抗原染色用抗体試薬と細胞表面抗原用抗体の組み合わせは細胞内タンパクの役割、機能のより詳細な解析を可能とするものでしょう。そのために、解析する細胞における対象となるタンパクの発現頻度や細胞の自家蛍光を予測し、機器のレーザーやフィルターの設定を把握し、適切な蛍光色素を割り当てる必要があります。



機器輸入販売元・試薬輸入元

日本ベクトン・ディッキンソン株式会社
東京都港区赤坂8-5-26 赤坂DSビル 〒107-0052
ホームページアドレス: www.bdj.co.jp

製造元
BD Biosciences

お問い合わせは下記までご連絡ください。
製造関連・資料請求(お客様情報センター):
☎ 0120-8555-90 Fax 024-593-5761
機器・メンテナンス(Life Science Support):
☎ 0120-7752-77
アプリケーション(技術研修室ホットライン):
Tel 03-5805-9960

試薬発売元



藤沢薬品工業株式会社

医療関連事業部 東日本営業所
〒101-0043 東京都千代田区神田富山町10-2
アセント神田ビル
TEL: 03-5256-5311 FAX: 03-5256-5370

医療関連事業部 西日本営業所
〒541-8514 大阪府大阪市中央区道修町3-4-7
TEL: 06-6206-7890 FAX: 06-6206-7934

ホームページアドレス:
<http://www.fujisawa.co.jp/reagent/>