

ISH 法プロトコル（浮遊法）

- ・ 2重蛍光 ISH 法
- ・ 単色 ISH 法

文責 基礎生物学研究所脳生物学研究部門 渡我部 昭哉

ver. 1.0 2005年6月14日

ver. 2.92 2010年1月17日

参考文献:

浮遊ISH法

- 1) Liang, F., Hatanaka, Y., Saito, H., Yamamori, T. & Hashikawa, T. (2000) *J Comp Neurol* **416**, 475-95.
- 2) Tochitani, S., Liang, F., Watakabe, A., Hashikawa, T. & Yamamori, T. (2001) *Eur J Neurosci* **13**, 297-307.

スライドガラス上の ISH 法

- 3) Schaeren-Wiemers, N. & Gerfin-Moser, A. (1993) *Histochemistry* **100**, 431-440.

2重蛍光 ISH 応用例

- 4) Komatsu, Y., Watakabe, A., Hashikawa, T., Tochitani, S. & Yamamori, T. (2005) *Cereb Cortex* **15**, 96-108.
- 5) Watakabe, A., Ohsawa, S., Hashikawa, T., & Yamamori, T. (2006) *J Comp Neurol* **499**, 258-73.
- 6) Watakabe, A., Ichinohe, N., Ohsawa, S., Hashikawa, T., Komatsu, Y., Rockland, K., & Yamamori, T. (2007) *Cerebral Cortex* **17**, 1918-33.

(1) 浮遊 2 重蛍光 ISH 法

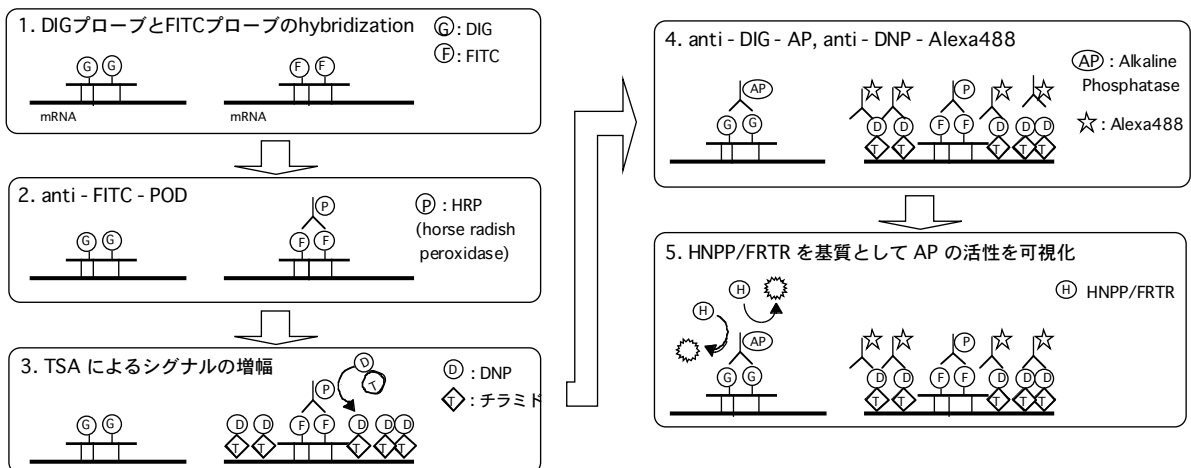
浮遊 ISH 法では、ホルマリン固定した脳標本を 15-50 μm 厚に薄切し、浮遊状態の切片を ISH に用いる。この方法は、クライオスタットでは作製が難しい中型哺乳類（サルなど）の成体脳標本などに適している。試薬、プローブが切片の両側から浸透するので、比較的厚めの切片でもきれいに染まる。2 重蛍光 ISH 法には、15-20 μm の薄い切片を使用するので切片を貼るときの手技がやや難しい。

2 重蛍光検出は以下のように行う。

FITC 標識 RNA \rightarrow anti-FITC-HRP(Peroxidase) \rightarrow TSA-DNP \rightarrow anti-DNP-Alexa488 \rightarrow 緑

DIG 標識 RNA \rightarrow anti-DIG-AP(alkalin phosphatase) \rightarrow HNPP/FR \rightarrow 赤

この方法の鍵は TSA (Tyramide signal amplification) によるシグナル増幅にある。TSA は CARD (catalyzed reporter deposition) 法の一つで、チラミド化したさまざまな低分子 (biotin, DNP など) を peroxidase 活性によってラジカル化させ、近傍の組織に付着させる。シグナル増幅能力は非常に高いが、条件をうまく整えないとノイズが高くすぎてしまう。2 重蛍光検出は TSA によって DNP に変換したハイブリシグナルを蛍光ラベルした抗 DNP 抗体で検出するとともに、もう一種類のシグナルは Alkaline Phosphatase の蛍光基質を使うことで検出する。



試薬、その他

- ・ 4% PFA (paraformaldehyde)/0.1M PB >濾過
- ・ 0.1M PB (phosphate buffer, pH7.0)>オートクレーブ
- ・ 0.75% Glycine/0.1M PB
- ・ 0.3% Triton X100/0.1M PB
- ・ PK バッファ (0.1M Tris.HCl (pH8.0), 50 mM EDTA)>オートクレーブ
- ・ アセチル化溶液
167 ml オートクレーブした超純水、 2.26 ml triethanolamine 0.3 ml HCl を混合したものを保存
使用直前に 5 μ l の無水酢酸 (acetic anhydride) を 2 ml 溶液に混和
- ・ マレイン酸 バッファ (0.1 M Maleic acid, 0.15M NaCl, pH7.5)
- ・ 10 % Blocking 溶液
(10 % Blocking reagents (Roche#1096 176) /マレイン酸バッファ)
オートクレーブして完全に溶かす。 分注して冷凍保存
- ・ 2% NLS(N-lauroylsarcosine) 温めてよく溶かすこと (白濁した液になる)。
- ・ ハイブリダイゼーション溶液 (約 50 ml)

20xSSC (3M NaCl, 0.3M Na-citrate)	12.5 ml
10 % Blocking 溶液	10 ml
Formamide (molecular biology grade)	25 ml
2% NLS	2.5 ml
10 % SDS	0.5 ml

- ・ 2xSSC/50% ホルムアミド/0.1% NLS
- ・ RNase バッファ (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 0.5 M NaCl)
- ・ 2xSSC /0.1% NLS
- ・ 0.2xSSC /0.1% NLS
- ・ TS7.5 (0.1 M Tris-HCl, pH7.5, 0.15M NaCl)
- ・ 1% Blocking 溶液 (10 % Blocking 溶液を TS7.5 で 10 分の 1 に薄める)
- ・ TNT (TS7.5, 0.05% Tween20)

- ・ Proteinase K (Roche: PCR grade #1 964 364)
- ・ RNase (RNaseA: sigma #R4642)

- ・ Peroxidase-IgG Fraction Monoclonal Mouse Anti-FITC (Jackson ImmunoResearch laboratory)

#200-032-037)

- Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragment (Roche)
- TSA-Plus DNP system (Perkin Elmer)
- Alexa Fluor 488-conjugated anti-DNP antibody (Molecular Probe)
- HNPP Fluorescent Detection Set (Roche)
- TS8.0 (pH8.0)
 - 0.1 M Tris-HCl (pH8.0)
 - 0.1 M NaCl
 - 10 mM MgCl₂
- Hoechst 33342 (Molecular Probe)
- CC/マウント (Diagnostic Biosystems : コスモバイオから入手可)。
- 保存用不凍液
 - 30 % glycerol, 30 % ethylene glycol, 40 % 0.1M PBS
 - (300 ml glycerol, 300 ml ethylene glycol, 400 ml 0.1M PB, 3.4g NaCl を混ぜる)
- DEPC 水
 - MilliQ 水 (超純水) に 0.1%(1000 分の 1)の DEPC を加え一晩おく。
 - ふたをゆるめてオートクレーブを 40 分行う。

容器類

切片の処理にはディスポの multiwell plate (6,12,24-穴)を使っている。使用后、軽く水洗いし、最後に DEPC 水でゆすいで再使用している。ハイブリ前の処理用には、RNase-free のものを使うこと。
(追記 : DEPC 水によるゆすぎは滅菌超純水で代用可。)

スライドガラスのコーティング

コーティング液>

1.25 g gelatin, 0.125 g Chromium Potassium sulfate を温めておいた MilliQ 水で溶かし、250 ml にする。ワットマンの濾紙を使って濾過。

新しいスライドガラスをホルダーにたてる。染色壺にコーティング液を入れ、ホルダーを 10 秒つけ、室温で 2、3 日乾燥させる。保存は数ヶ月から数年可能。乾燥直後は、切片が張り付いて使いにくい。

使用する脳サンプルについて

4% PFA/0.1M PB (pH 7.0)で灌流固定し、30% sucrose/0.1M PB 中で4℃で平衡化したものを、凍結切片用に準備する。Sucrose の作製の際にはできれば DEPC 水を使う。必ずしもこの固定条件でなくとも良いが、固定の仕方は ISH に大きく影響することは注意する必要がある。なお脳ブロックは-80℃で長期間保存可能である（補足も参照のこと）。

RNA プローブについて

DIG あるいは FITC 標識したアンチセンスプローブを用意。別プロトコル参照のこと。プローブは-30℃で保存可。凍結融解を少々繰り返してもあまり ISH には影響しない。

一般的注意

<サンプルのハンドリング>

プローブ用の RNA や、ハイブリ前のブロック、切片を扱う際には RNase-free に留意すること。手袋着用。RNase は非常に安定で、オートクレーブしても完全には失活しない。分子生物学がルーチンで動いているラボでは、意識していないと RNase でラボ中が汚染されていることもありうる（キアゲンのプラスミドキットなど）。RNase は決められた場所で使い、高濃度 RNase に使用したチップ、チューブは専用の捨て場を使うこと。RNase 除去用の洗剤(RNaseZAP など)も有効。私たちは”absolve(NEN)”を使っている。

<ハイブリの特異性について>

ハイブリダイゼーションパターンの特異性は常に気をつける必要がある。必須のコントロールはセンス鎖プローブである。しかし、センス鎖プローブでバックグラウンドシグナルがなくても、ハイブリのシグナルが特異的だとは限らない。同じ遺伝子の異なる領域をプローブに使っても、同じシグナルパターンになることを確かめるのは良いコントロールになる。また同じパターンなら二つのプローブをミックスしてシグナルを増強できる。GC リッチな配列は非特異的なバックグラウンドが出やすいので避けること。

私の考えでは ISH の特異性を信じられる一番の要因は、パターンそのものである。もし特徴的なパターンが再現性良く観察できるなら、ISH の特異性も信じやすい。逆にどの細胞でもシグナルが見えるようなら、ISH が特異的であることを確認するためのコントロール実験を特に慎重に行う必要がある。なお非特異的なハイブリダイゼーションは必ずしも均一ではない。海馬の歯状回などは高いバックグラウンドが出やすい。非特異的なバックグラウンドが疑われる時は、ハイブリの温度条件を変えることを勧める。このプロトコルの標準は 60℃だが、プローブによっては 65℃、68℃、72℃などにしないと、特異的なパターンが出ない場合がある。温度を変えるとパターンが変わるのなら、クロスハイブリダイゼーションが起こっていると考えられる。ただし、あまり GC リッチすぎると、ハイブリの温度を 72℃にしてもバックが出ることもあるので過信しないこと。

<DIG プローブについて>

in vitro 転写時に使う DIG-UTP が大量に混入するとバックが出る。普通のエタノール沈殿だけだと高濃度のヌクレオチドは完全に除去できないので、カラム精製の方が良い。RNA プローブには、他の遺伝子と相同性が低く、GC%が 50%に近い 500-1000 塩基くらいの配列を選んでいる。一般に長いほどシグナルは強い。ただし 1kb を超える長さだと加水分解しないと逆にシグナルは弱くなる。

簡易プロトコル:

<DAY0> 切片作製 4% PFA で後固定	4°C overnight	
<DAY1> 0.1M PB 0.75% Glycine/0.1M PB 0.3% Triton X100/0.1M PB 0.1M PB PK 処理 アセチル化溶液 0.1M PB プレハイブリダイゼーション ハイブリダイゼーション	 10 min x 2 15 min x 2 20 min 5 min 37°C 30 min 10 min 10 min x 2 60°C 1 hour 60°C~72°C overnight	前処理 ハイブリ
<DAY2> 2xSSC/50% formamide/0.1% NLS RNase バッファ RNase (20µg/ml) 2xSSC /0.1% NLS 0.2xSSC/0.1% NLS TS7.5 1% Blocking reagent anti-FITC-HRP 1/4000 in 1% Blocking TNT DNP working solution TNT anti-DIG-AP 1/1000, anti-DNP-Alexa488 1/500 in Blocking 溶液	 60°C 15-20 min x 2 5 min 37°C 30 min 37°C 15-20 min x 2 37°C 15-20 min x 2 5 min 1 hour 2-5 hours 室温 or o/n 4°C 15 min x 3 30 min 10 min x 3 2-5 hours 室温 or o/n 4°C	洗い 抗体 1 洗い TSA 洗い 抗体 2
<DAY3> TNT TS8.0 HNPP/Fast Red TR PBS-EDTA Hoechst 33342 (1µg/ml in PBS) PBS-EDTA	 15 min x 3 10 min 20-40 min 3-5 min x2 5 min 3-5 min x2	洗い 蛍光発色 Counterstain (optional)
スライドガラスにマウント(in PBS) CC/マウント	風乾 1~5 時間	封入

詳細プロトコル:

<DAY0>

<切片作製>

灌流固定した脳をスライディングスライサーで薄切し、4% PFA/0.1M PB (pH 7.0) 中で一晩後固定する。薄切した切片は保存用不凍液中で-30℃で長期保存可能。

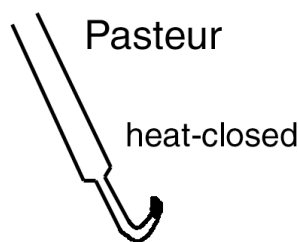
<DAY1>

注意：この日の作業はすべて RNase-free の環境で行うこと！！

<PK 前処理>

0.1M PB	10 min x 2
0.75% Glycine/0.1M PB	15 min x 2
0.3% Triton X100/0.1M PB	20 min
0.1M PB	5 min

切片をマルチウェルプレート中で上記のバッファで洗浄。切片を火で曲げたパスツールピペットを使って順次移す。必要バッファ量は、6 ウェルプレートで約 4ml/ウェル、12 ウェルプレートで 2-2.5ml/ウェル程度。



<PK 処理～アセチル化>

1. Proteinase K を PK バッファで薄める。濃度は予備実験によって決めること。この過程は ISH の結果を大きく左右する。成体マウスの場合、0.5~3.3 μg PK/ml 成体サルの場合 5~10 μg PK/ml くらい。胎児の場合は、もっと下げる必要がある。
2. 切片を、用意した PK 溶液に移し軽く浸透しながら 37℃で 30 分保温。
3. PK 処理中にアセチル化溶液を 2 ml ずつ (12 ウェルプレート) 分注しておく。

4. 反応が終わったらプレートをインキュベーターから出す。
5. 分注しておいたアセチル化溶液に無水酢酸 (acetic anhydride) 5 μ l を各ウェルに入れ、軽く混ぜる。
6. 切片をアセチル化溶液に移し 10 分間処理する。
7. 0.1M PB で 10 分間 2 回洗浄する。

<プレハイブリダイゼーション>

1. ハイブリダイゼーション溶液をプレートに分注し 60°C に温めておく。各サンプルにつき、プレハイブリ用に 1 ml、ハイブリ用に 800 μ l のハイブリ液を分注しておく。量は経験的に決めている。ひたひたなら多分大丈夫。
2. PK 処理、アセチル化処理、洗いの終わった切片をハイブリ液に移し 45 分保温。
3. 切片を新しいハイブリ液に移しさらに 15 分保温を続ける。次のステップではここに薄めた RNA プローブを加える。

<ハイブリダイゼーション>

1. プレハイブリダイゼーション中に、DIG ラベルされた RNA プローブ (2 重染色の場合は FITC ラベルされた RNA プローブも同時に) をハイブリダイゼーション液に薄める (0.5-1 μ g/200 μ l)。DIG プローブのハイブリダイゼーション中の終濃度が 0.5-1 μ g/ml になるように必要量のプローブを用意する。例えば、1 ml でハイブリするなら、0.5-1 μ g 分の DIG RNA を 200 μ l のハイブリ液に薄めておき、切片が入っている 800 μ l のハイブリ液に加える。複数のプローブをミックスする場合は、プローブの総量が DIG/FITC プローブそれぞれ、1 μ g/ml 以下になるようにする。
2. RNA プローブを 80°C で 5 分処理し、氷上で急冷する。60°C インキュベーターに入れ、使うまで保温。
3. プレハイブリダイゼーションが終わったら、プレートの各ウェルに RNA プローブを入れていく。軽く攪拌したあと、60°C で一晩ハイブリダイゼーションさせる。プローブによっては、65°C、68°C、72°C でハイブリダイゼーションする。

<DAY2>

ハイブリ以降は RNase には気をつけなくてよい。

<洗浄>

1. 2xSSC/50% formamide/0.1% NLS は 60℃（ハイブリダイゼーションと同じ温度）に温めておく。切片を移し、15-20 分 2 回洗浄。ハイブリ後は切片がもろくなっているので気をつけて。切片を移すときは温度が下がらないようにヒートブロックなどで温めながら移すと良い。
2. RNase Buffer に切片を移し室温で 5 分程度おく。この間に RNaseA を RNase buffer で終濃度 20 μ g/ml に薄め、分注しておく。RNase は専用エリアで使い、チップ、廃液は専用捨て場に捨てること。
3. 切片を RNase 溶液に移し 37℃で 30 分保温。
4. 2xSSC /0.1% NLS に切片を移し 37℃ 15-20 分 2 回洗浄。
5. 0.2xSSC /0.1% NLS に切片を移し 37℃ 15-20 分 2 回洗浄。
6. TS7.5 に切片を移し 5 分間おく。

<TSA (Tyramide signal amplification)>

FITC 標識した RNA は、まず peroxidase 標識した抗 FITC 抗体で認識し、TSA 試薬を使って peroxidase 活性を DNP 分子の集積に転換する。

1. 切片の洗浄中に 10% Blocking 溶液を TS7.5 で 10 倍に薄めて 1% Blocking 溶液を作っておく。洗浄終了後切片を 1% Blocking 溶液に移し、室温で 30 分-1 時間おく。
2. ブロッキング中に、anti-FITC-HRP 抗体を 1% Blocking 液で 1/4000 に薄める。
3. 切片を抗体液につけ、室温で 2-5 時間、もしくは 4℃で一晩（～週末の間置く場合は抗体をさらに薄める必要あり。1:2000 は室温 2 時間が基本）おく。
4. TNT で 15 分ずつ 3 回洗浄する。
5. DNP working solution を作る。DMSO に溶かしたストック溶液（量は会社のマニュアルを見ること）を 1xPlus amplification diluent で 1:50 に薄める。この試薬は非常に高価だが、あまりケチるとまったくシグナルが増幅しなくなる。目安はマウス、ラットの切片なら数枚当たり 500 μ l くらい。サルの frontal section 片側の真ん中辺で一枚 500 μ l とか。
6. 切片を DNP working solution に入れて室温 30 分。
7. TNT で 10 分ずつ 3 回洗浄する。

<蛍光ラベル>

TSA で増幅したシグナルは DNP 分子に転換しているので、Alexa488 で標識した抗 DNP 抗体により蛍光シグナルに変える。一方 DIG 標識した RNA のシグナルはアルカリンフォスファターゼ標識した抗

DIG 抗体で認識し、HNPP/FR を基質としてフォスファターゼの酵素反応を行い蛍光シグナルに変える。

1. 2 種類の抗体を混合して希釈。Anti-DNP-Alexa488 は 1/500, Anti-DIG-AP は 1/1000 に 1% blocking 液で希釈。
2. 切片を抗体溶液に移し、室温 2-5 時間、もしくは 4℃でオーバーナイト。

<DAY3>

蛍光ラベルの続き。洗いと発光反応。

3. TNT で 15 分ずつ 3 回洗浄する。
4. アルカリバッファ (TS8.0) 中で 10 分間平衡化する。
5. 待ち時間に、酵素基質である HNPP/FR 反応液を調製。FastRed/TR(粉末)をミリ Q 水で 5mg/200 μ l に溶かす。この溶液は 4℃保存で 2 週間は使える。TS8.0 で FastRed 溶液と HNPP 液を 1/100 ずつに薄めたものを working solution とする。色素の沈殿物が生じるのでフィルターを通した方がよい。
6. 切片を HNPP/FR 液に移し反応を開始する*。
7. 反応は通常 20 分から 40 分行っている。反応液を変えて長時間反応するとシグナルが強くなる場合もある。
8. 切片を PBS-EDTA 液で 3-5 分ずつ 2 回洗浄して、反応を停止する。
9. Hoechst 33342 (1 μ g/ml in PBS) に切片を移し、5 分染色 (オプション)。
10. 切片を PBS-EDTA 液で 3-5 分ずつ 2 回洗浄
11. 発色停止した切片は遮光して氷上におく。ただちにマウントすること。

<切片のマウント>

ゼラチンコートしたスライドガラス上に切片をマウントする。シャーレに PBS を入れ、そこにスライドガラスをつけ、絵筆を使って切片を引っ張り上げる。マウント液で湿らせた絵筆で形を整え、ある程度整ったら絵筆の水分をキムワイプで拭き取り、余分なマウント液を絵筆で吸い取りながら均一に乾くように注意しながら形を整えていく。15-20 μ m 厚の切片をきれいに貼るのは非常に難しい。あまり欲張らず注目している部分に集中すること。

HNPP/FR の蛍光シグナルは私たちの感触では、TSA よりも SN 比が良い。ところがその蛍光シグナル

は不安定で、非常に diffuse しやすい。一番 diffuse しやすいのはマウントのステップなので、ここはできるだけ迅速に行うこと。また切片は貼るまで氷上で冷やしておいた方がいい。浮遊状態でしばらくおいておくとシグナルは diffuse して消えてしまう。一端乾燥してしまえば大丈夫なので、乾燥状態では数時間放置できる。もしシグナルの diffuse が疑われるときは、スライドガラス上で、もう一度 HNPP/FR の反応をすると良い。アルカリンフォスファターゼは簡単には失活しない。

マウントした切片が乾燥したら、一度 TNT にスライドガラスを浸して「戻し」、乾かないように気を付けて CC/マウント（水溶性封入剤）で封入する。

封入材の選択は重要である。私たちが試した中で唯一封入による diffuse を避けられたのが PermaFluor だった。封入後のサンプルは-20 度で凍らせて保存しておくとかかなり長持ちする。乾燥による組織の劣化さえ避けられれば 1 ヶ月くらいはシグナルは持つ。ただし、HNPP/FR のシグナルは拡散しやすいので早めに写真撮影することを勧める。

PermaFluor は生産中止になりました。現在 CC/マウント (Diagnostic Biosystems : コスモバイオから入手可) を使用しています (Sep 2008)。同じメーカーの Fluoromount だと長期保存するとシグナルが diffuse してしまうので注意。

* マウントする切片の数が多いときは、HNPP/FR の反応を行う前に切片をスライドガラスに貼ってしまっても良い。その場合は、マウントした切片が乾燥した後、TS8.0 に 10 分おいて「戻し」、HNPP/FR の反応液を乗せてカバーガラスをおき、暗所で 20-40 分反応させる。スライドガラス上で反応する場合は色素の沈殿物がつきやすいので、作製した HNPP/FR 液はフィルターに通すこと。

補足

<2重蛍光 ISH 法の感度について>

ISHの感度はプローブ標識、検出方法によって少しずつ違う。個人的な感覚としては DIG-NBT/BCIP>DIG-HNPP/FR>>FITC-HNPP/FR, DIG-TSA.DNP, FITC-TSA.DNP という順番。

標準的には発現の強いマーカー遺伝子を FITC 標識し、TSA-DNP で検出、弱い発現の遺伝子を DIG 標識し、HNPP/FR で検出しているが、弱いもの同士を比べる時は、DIG, FITC のラベリング及び TSA, HNPP/FR の組み合わせを変える必要がある。(例えば片方は FITC 標識して、anti-FITC-AP で HNPP/FR, もう一方は DIG 標識して anti-DIG-POD で TSA-DNP など)。DIG-HNPP/FR の感度はかなり強く、NBT/BCIP の感度に迫るが、弱い発現の場合うまくシグナルが見えないこともある。それに上述の通り、シグナルが diffuse しやすくバックグラウンドも高い。切片厚が 20 μ m を超えるとシグナルはバックグラウンドに負けてしまう。(Confocal 顕微鏡をうまく使えば、厚い切片でも可能。)

<蛍光検出の交差反応、反応障害について>

この2重蛍光 ISH法で、どの程度二つの遺伝子の蛍光検出がお互いに邪魔し合うのかを調べるために、同じ遺伝子の違う部分の配列を DIG 及び FITC プローブとして2重蛍光 ISH法を行った。この両者は配列は違うが同じ遺伝子に対するプローブなので、ハイブリ時の干渉はなく、まったく同じ細胞群でそれぞれ強い ISH シグナルが検出できた。そこで交差検出の可能性を調べるために、片側のプローブのみを入れて2重蛍光 ISH法を行ったところ、他方側の蛍光検出域にはまったく漏れが検出されなかった。次に片方の蛍光検出が他方の検出を障害する可能性を調べた。弱いシグナルに対し、強い反対側のシグナルが存在する場合のモデル実験をするために、ISHの検出に必要なプローブ量の titration を行った。終濃度 40ng/ml までプローブ濃度を下げても ISH 強度にはさほど影響は出なかったが、10ng/ml ではかなりシグナル強度が下がった。そこで片側プローブの濃度を 10ng/ml にし、反対側のプローブをその 40 倍加えて2重蛍光 ISH法を行ったところ、少ない側のシグナルの出方はまったく障害されなかった。以上のモデル実験から、2重蛍光 ISH法は単独の ISH法と同様の結果をもたらすことが確認された。

以上の実験は比較的発現レベルの高い遺伝子を用いて行ったが、遺伝子によっては、極端に発現量が高い場合もある。実はあまりに遺伝子発現量が高い場合には交差検出が起こりうる。ある遺伝子 N はサル新皮質の巨大錐体細胞で非常に高い発現を示すのだが、この遺伝子を FITC 標識し通常の条

件で2重蛍光 ISH 法を行ったところ、DIG プローブなしでも弱いながらも、赤の波長域にシグナルが見られた。この場合、交差をなくすために TSA-DNP を 16 倍に薄めて検出を行った。発現量が非常に高い遺伝子については注意が必要である。

(2) 通常の ISH 法

遺伝子一つに対する通常の ISH は、TSA の増幅を行わずアルカリンフォスターゼの基質に NBT/BCIP 溶液を使えば良い。NBT/BCIP が反応すると、青紫色の不溶性物質が組織に沈着する。

簡易プロトコル:

<DAY0> 切片作製 4% PFA で後固定	4°C overnight	
<DAY1> 0.1M PB 0.75% Glycine/0.1M PB 0.3% Triton X100/0.1M PB 0.1M PB PK 処理 アセチル化溶液 0.1M PB プレハイブリダイゼーション ハイブリダイゼーション	 10 min x 2 15 min x 2 20 min 5 min 37°C 30 min 10 min 10 min x 2 60°C 1 hour 60°C~72°C overnight	前処理 ハイブリ
<DAY2> 2xSSC/50% formamide/0.1% NLS RNase バッファ RNase (20µg/ml) 2xSSC /0.1% NLS 0.2xSSC/0.1% NLS TS7.5 1% Blocking reagent anti-DIG-AP 1/1000 in Blocking 溶液	 60°C 15-20 min x 2 5 min 37°C 30 min 37°C 15-20 min x 2 37°C 15-20 min x 2 5 min 1 hour 2-5 hours 室温 or o/n 4°C	洗い 抗体
<DAY3> TNT TS9.5 NBT/BCIP 発色 PBS-EDTA スライドガラスにマウント(in マウント液) Entellan に封入	 15 min x 3 10 min 30 min-2 days 3-5 min x2 風乾 1~5 時間	洗い 発色 停止 マウント 封入

試薬

- ・ TS9.5 (0.1 M Tris-HCl (pH9.5), 0.1 M NaCl, 10 mM MgCl₂)
- ・ NBT/BCIP ストック溶液
Roche (1681451)
- ・ PBS-EDTA (PBS+ final 10 mM EDTA)
- ・ マウント液 (0.1 % gelatin, 40 % ethanol と PBS を 1:1 で混合)

- ・ Emtellan New (非水溶性封入剤)
和光純薬(501-05301): Merck(1.07961)

詳細プロトコル:

ハイブリの際には DIG (もしくは FITC) 標識した RNA プローブ 1 種類のみを用いて行う。一般に DIG 標識したプローブがもっとも感度が良い。前処理から、ハイブリ、ブロッキングまでは、2 重染色の場合と同様に行う。ブロッキング以降は DIG (もしくは FITC) 標識を抗 DIG-AP 抗体で認識し、NBT/BCIP を基質として発色する。NBT/BCIP は、アルカリリンフォスファターゼによって青紫色の発色をする。

<ブロッキング以降>

1. ブロッキング中に、anti-DIG-AP 抗体を 1% Blocking 液で 1/1000 に薄める。
2. 切片を抗体液につけ、室温で 2-5 時間、もしくは 4℃で一晩おく。
3. TNT で 15 分ずつ 3 回洗浄する。

<発色>

1. 切片を TS9.5 中で 10 分間平衡化する。
2. 酵素基質である NBT/BCIP 液を TS9.5 で 5 0 倍に薄めて分注しておく。
3. 切片を NBT/BCIP 液に移し反応を開始する。
4. 反応は数十分～数時間かかるので、ビノキュラで発色の程度をモニターしながら、適当な時間で止める。組織やハイブリの温度によって、バックグラウンドの出方は異なる。場合によっては数十時間反応することも可能。
5. 切片を PBS-EDTA 液で 5 分ずつ 2 回洗浄して、反応を停止する。

6. 発色停止した切片は遮光して 4℃保存。1 週間くらいは保存可能。ただし洗いが不十分だと、シグナルが diffuse して消えてしまうこともあるので注意。

<切片のマウント>

ゼラチンコートしたスライドガラス上に切片をマウントする。マウント液 (0.1% gelatin, 40 % ethanol と PBS を 1:1 で混ぜる/もしくは 10 分の 1 に薄めた PBS など)中にスライドガラスをつけ、絵筆を使って切片を引っ張り上げる。マウント液で湿らせた絵筆で形を整え、ある程度整ったら絵筆の水分をキムワイプで拭き取り、余分なマウント液を絵筆で吸い取りながら均一に乾くように注意しながら形を整えていく。

マウントした切片は封入前によく乾燥させる。

1~5 時間程度の乾燥で封入可能だが、数日~2 週間くらい放置しても良い。

封入は以下の手順に従って包埋する。

ただし脱水が不十分だと NBT/BCIP のシグナルはキシレンで拡散するので 100%エタノールはフレッシュなものを使うこと。

100 % Methanol	10 min	
100 % Ethanol	10 min x2	(新鮮なエタノールを使うこと)
100% Xylen	10 min x2	
Entellan		

メタノールで処理すると、赤色のバックグラウンドがかなり抜ける。

エタノールシリーズ(70% > 90% > 95%)で脱水することもできる。この場合、95%エタノールで長時間置いておくと、より青色にすることもできるが、シグナル量も減る。

メタノール処理をスキップして、100%エタノール処理を直接行くと、赤色のバックグラウンドの「抜け」が不自然になる。

(3) その他

(A) 組織の調製について

このプロトコルは、灌流固定した脳標本を使用することを前提としている。ISH 法は抗体染色に比べると灌流ムラの影響は出にくい印象があるが、灌流固定の出来不出来はやはり結果に影響してくる。私たちは通常へパリン入り生理食塩水に続いて、4% PFA/0.1M PB で灌流固定しているが、グルタルアルデヒド、ピクリン酸入りの固定液でも ISH 法に使えるようである。私は灌流固定に続いて室温 3~5 時間 and/or 4℃オーバーナイトの後固定を行ってから、30% sucrose/0.1M PB に置換することが多い。

固定液中では RNase も固定されるため、そのステップで RNA が壊れることは考えにくいだが、30% sucrose 溶液に置換するステップで RNA が壊れてしまう危険性がある。そこで sucrose 液はできるだけ DEPC 処理した水を使って作るようにしている。

-80℃で冷凍保存しておけば、組織ブロックはかなり長い間 ISH に使う事ができる(多分 5 年以上 OK)。ただし cytochrome oxidase 染色などの法は長期保存するとうまく行かなくなる。

(B) プローブの加水分解プロトコル

プローブの長さが 1000 塩基前後なら加水分解しなくても十分 ISH に使える。1200 塩基くらいまでのプローブは普通はそのまま使う。少しでもシグナルを強くしたい場合(800 塩基以上の場合)や、2000~3000 塩基以上の長い RNA プローブの場合は以下のプロトコルで加水分解して用いると良い。ただしバックグラウンドが上がる可能性があるのでコントロールには気をつけること。

Reagents:

0.25M NaHCO₃

0.25M Na₂CO₃

Hydrolysis buffer

Mix 2 ml of NaHCO₃, 3 ml of Na₂CO₃ and 5.75 ml DEPC-treated water.

(This is expected to be 0.1M Na-CO₃ buffer, pH 10.2)

Protocol>

>In vitro transcription in 20 ul.

>Add 180 ul Hydrolysis buffer and incubate at 60C for appropriate time.

Probe length (kb)	0.8	1.0	1.2	1.5	2	2.5
Time (min)	7	9	11	12	14	15

> Immediately place the tube on ice and add 1 ul of glacial acetic acid.

> Add 20 ul of 3M NaOAc, 500 ul EtOH and mix well.

> Immediately spin at 14000 rpm for 15 min.

> Discard the sup. Dissolve the pellet to 50 ul STE.

> ProbeQuant G-50 spun column.

> Ethanol precipitate.