

ISH 法プロトコル (浮遊法)

・ 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. 2.8 2008年3月16日

参考文献:

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

はじめに

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。

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 μl 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)
- ・ Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragment (Roche)

- ・ 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)

- ・ 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-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

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。

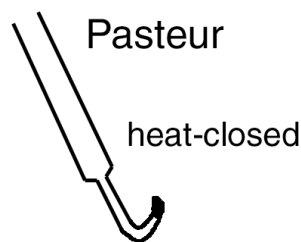
<DAY1>

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。

<抗体検出>

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-DIG-AP 抗体を 1% Blocking 液で 1/1000 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℃で一晩おく。
4. 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 50 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、ピ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。

補足説明：

(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°C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ですが、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°C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.