

# スライドガラス 2重蛍光 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9月30日

ver. 1.2 2007年8月30日

ver. 1.3 2007年12月20日

ver. 1.4 2008年9月20日

ver. 1.5 2010年1月17日

## 参考文献:

### スライドガラス上の ISH 法

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

### 2重蛍光 ISH 応用例

2) Komatsu Y, Watakabe A, Hashikawa T, Tochitani S, Yamamori T. (2005) *Cereb Cortex*. 15:96-108.

3) Komine Y, Nakamura K, Katsuki M, Yamamori T. (2006) *Mol Cell Neurosci*. 31: 273-83.

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.

## (1) はじめに

スライドガラス ISH 法では、未固定（固定脳でも可）の脳標本を 10-20 $\mu$ m 厚に薄切し、スライドガラスに貼り付けた状態の切片を ISH に用いる。この方法は、浮遊法ではばらばらになってしまう胎児サンプルや、成体でもマウス、ラットなどクライオスタット標本の作りやすい小型哺乳類の脳標本などに適している。ヒトのバイオプシー標本にも良いと考えられる。ステップ数が少なく簡単なプロトコルで条件設定はほとんど必要ない。バックグラウンドは比較的低く、未固定脳なら感度も高い。固定脳を使う必要がなければおすすめのプロトコル。試薬、プローブの浸透は、浮遊法に比べるとあまり良くないので、NBT/BCIP を使った単色の ISH の場合には相対的に浮遊法の方が「きれいな」ISH の写真を撮れるような印象があるが、2重蛍光 ISH 法の場合はむしろスライドガラス法の方が向いているかも知れない。

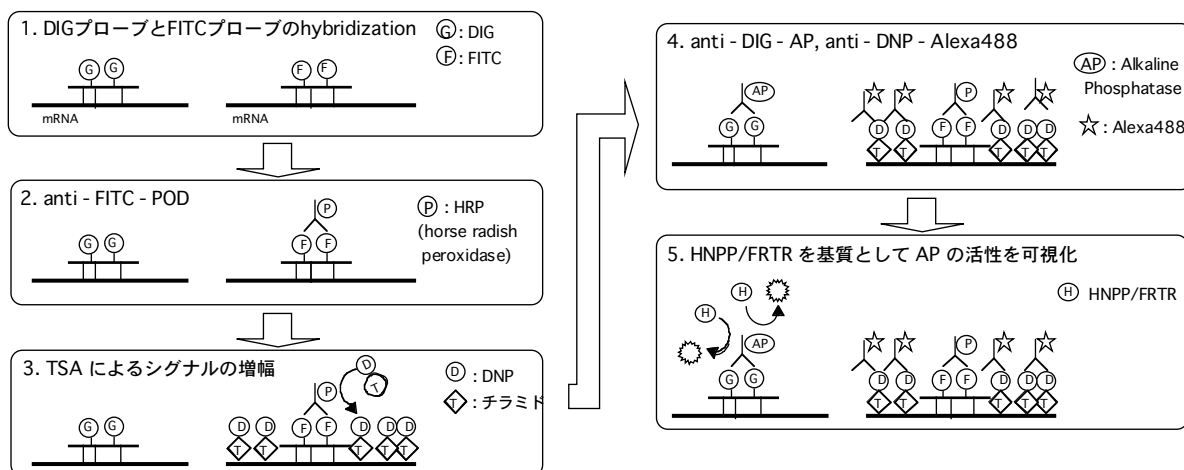
2重蛍光検出は以下のように行う。

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ですぎてしまう。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

- ・ PBS >オートクレーブ
- ・ 4% PFA (paraformaldehyde)/0.1M PB or PBS
- ・ 0.1M PB (phosphate buffer, pH7.0)>オートクレーブ
- ・ 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  
177 ml オートクレーブミリQ水、 2.4 ml triethanolamine 0.4 ml HCl を混合  
使用直前に 0.45 ml の無水酢酸 (acetic anhydride) を 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
- ・ ハイブリダイゼーション溶液 (40 ml)

原液		最終濃度
20xSSC (3M NaCl, 0.3M Na-citrate)	10 ml	5x
Formamide (molecular biology grade)	20 ml	50 %
100x Denhardt's 溶液 (2% Ficoll400, polyvinylpyrrolidone, BSA)	2 ml	5x
Yeast tRNA (10mg/ml: sigma R8759)	1 ml	250 $\mu$ g/ml
Salmon sperm DNA (10mg/ml: sigma D1629:超音波で断片化)	2 ml	500 $\mu$ g/ml

- ・ 0.2xSSC (20xSSC を MilliQ 水で 10 倍希釈)
- ・ 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)
- 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 MgCl<sub>2</sub>
- Hoechst 33342 (Molecular Probe)
- CC/マウント (Diagnostic Biosystems : コスモバイオから入手可)。
- DEPC 水
  - MiliQ 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。

## 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。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ので気をつける。このプロトコルでは比較的厳しい条件でハイブリさせるため、バックグラウンドは出にくく、かなり GC リッチなプローブでも非特異的なハイブリダイゼーションは起こりにくい。逆にプローブが AT リッチな時は、シグナルが弱くなることがある。

#### <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、カラム精製した方が良い。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。このプロトコルではもともとプローブの浸透性は低いようで、浮遊法と違ってプローブが長くてもシグナルが弱くなる傾向は見られなかった。

簡易プロトコル:

<DAY1> 凍結試料ブロック作成、切片作成	-70℃で保存可	
4% PFA	10 min	前処理
PBS	3 min x 3	
(PK treatment)#	37℃ 30 min	固定サンプル用
(4% PFA)#	5 min	固定サンプル用
(PBS)#	3 min x 3	固定サンプル用
アセチル化	10 min	
(0.3% Triton X100/0.1M PB)#	20 min	固定サンプル用
PBS	5 min x 3	
Hybridization sol.	Room temp briefly	
Hybridization sol.+RNA probe	72℃ overnight	ハイブリ
<DAY2>		
0.2xSSC	72℃ 30 min x 3	洗い
TS7.5	5min	
1% Blocking reagent	1 hour	ブロッキング
1/4000 anti-FITC-HRP in 1% Blocking reagent	2~5 hours at room temp (or overnight at 4℃)	抗体 1
TNT (TS7.5, 0.05% Tween20)	10 min x 3	洗い
TSA-Plus (DNP) 1:50:50 \$	3-10 min	TSA
TNT	5 min x 3	洗い
1/1000 anti-DIG-AP, 1/500 anti-DNP Alexa488 in 1% Blocking reagent	2~5 hours at room temp or overnight at 4℃	抗体 2
<DAY3>		
TNT	15 min x 3	洗い
TS8.0	10 min	
HNPP/Fast Red TR	20-40 min	蛍光発色
PBS-EDTA	3-5 min x2	
Hoechst 33342 (1µg/ml in PBS)	5 min	Counterstain (optional)
PBS-EDTA	3-5 min x2	
CC/マウントで封入	乾かさないうこと	封入

# 未固定脳には不要。

\$ TSA 試薬をキット付属の薄め液で 1:50 に薄めたものに等量の水を加えてさらに半分に薄める。

## 詳細プロトコル:

### <DAY1>

#### <切片作成>

脳ブロックをクライオスタットで切片にし、スライドガラス上取る。スライドガラスはAPSコート、もしくはMASコートしたものを使う（マツナミなど）。スライドガラスは新品のものをそれ以上滅菌する必要はないが、ISH用に使うスライドガラスは専用にし、素手では触らないように気をつけること。切片を取ったスライドガラスは20分間風乾させ-70℃で保存する。ISH用には長期保存可。

#### <前処理>

この日の作業はすべてRNase-freeの環境で行うこと！！

4% PFA	10 min	
PBS	3 min x 3	
* (PK treatment)#	37℃ 30 min	固定サンプル用
(4% PFA)#	5 min	固定サンプル用
(PBS)#	3 min x 3	固定サンプル用
アセチル化	10 min	
(0.3% Triton X100/0.1M PB)#	20 min	固定サンプル用
PBS	5 min x 3	

\*をつけたステップは、水でしめらせたキムタオルを敷いた上に、箱に合わせて切断した0.2mlのディスプレイピペットを置き、スライドガラスの台とする。その上にスライドガラスを並べそれぞれに液をのせて行く。通常のスライドガラスで300 $\mu$ lくらいが標準。安い試薬は500~1000 $\mu$ lのせるとやりやすい。高い試薬を節約する時は、150-200 $\mu$ lくらいをのせて均一に切片が覆われるようにカバーグラスをかける。

ハイブリダイゼーション前のスライドガラスの前処理。

感熱滅菌した染色壺を5つ用意する。1つはPFAを入れ、1つはアセチル化溶液を入れる。

残りの3つは洗浄用のPBSを入れる。

- 1) 切片の載ったスライドガラスをラックに入れ、4%PFAにつけ、2, 3回ラックを上下させた後、室温で10分放置。冷凍保存しておいたスライドガラスを使うときは、結露しないように迅速にPFA液につけること。
- 2) PBSで3回洗浄。洗浄の際にはラックを傾けてできるだけ液を除き、PBSにつけたあと数回上下

する。壺を3つ順々に使う。(未固定脳の場合5へ)

- 3) 未固定脳の場合不要だが、固定切片を使う場合は、proteinase K (PK) 処理をした方がよい。特に成体脳の場合は、PK 処理をしないとかなり感度が落ちる。PK の濃度は予備実験で決めておくこと。マウス成体脳の場合、0.5-1 $\mu$ g PK/ml くらい。胎児~新生児の場合は、もっと下げる必要がある。PK 処理は、水をしめらせたキムタオルを下に敷いた湿箱中に、ラックからスライドガラスを移して、一枚ずつ PK 液を乗せて行う。
- 4) PK 処理後、先ほど使った PFA 液で5分間、後固定する。その後先ほど使った PBS を再使用して、3回洗浄する。
- 5) 調製済みのアセチル化溶液が入った壺にラックを入れる。スライドガラスに直接当たらないように、ラックを持ち上げて、ピペットマンで無水酢酸をまんべんなく壺に入れ、すぐにラックを上下させて無水酢酸を攪拌し、10分静置する。(未固定脳の場合7へ)
- 6) 固定切片の場合は TritonX100 で20分処理する。(未固定脳の場合は不要)
- 7) PBS を新しいものに入れ替えて5分ずつ3回洗浄する。

#### <ハイブリダイゼーション>

平箱にキムタオルを敷き、50%ホルムアミド/5xSSC でしめらせる。その上に箱に合わせて切断した0.2mlのディスポピペットを置き、スライドガラスの台とする。ハイブリダイゼーションは液が乾かないように、この湿箱中で行う。

- 8) ラックからスライドガラスを取り出し、キムタオルでサンプルの載っていない面を拭く。切片が乾かないうちにハイブリダイゼーション液をスライドガラスに乗せ(通常サイズのスライドで0.5~1ml程度)室温で静置する。切片をハイブリ液になじませるのが主目的なので、この時間は15分~30分程度でも十分。
- 9) プローブ溶液を準備。RNA プローブを終濃度 0.5 $\mu$ g/ml になるようにハイブリ液で薄める。DIG/FITC プローブそれぞれこの濃度で調製する。感度を上げる目的で1遺伝子に複数プローブを混合して使う場合には、等モル量ずつ全体の最終濃度を 0.5 $\mu$ g/ml に合わせる(例えば A 遺伝子 1/DIG 0.25 $\mu$ g/ml, A 遺伝子 2/DIG 0.25 $\mu$ g/ml, B 遺伝子/FITC 0.5 $\mu$ g/ml)。プローブ液の量はスライドガラス一枚当たり 300 $\mu$ l くらい。必要分を調製し、80 $^{\circ}$ Cで5分熱した後、氷で急冷する。
- 10) スライドガラスを傾けてハイブリ液を捨てる。RNA プローブの入ったハイブリ液を上層し、乾燥しないようにカバーグラス(乾熱しておく)をかぶせ、湿箱に戻し、フタをきっちりしめて72 $^{\circ}$ Cで終夜ハイブリする。湿箱の上に翌日使う染色壺をのせておくと湿箱の乾燥がかなり抑えられる。翌日洗浄に使う 0.2XSSC を72 $^{\circ}$ Cで温めておくこと。



## <DAY2>

### <洗浄>

72℃に温めた 0.2XSSC 液を 2 つの染色壺に入れ、片側にラックを立てておく。ラックを入れていない染色壺の液中でカバーガラスをはずしたら、もう一つの染色壺中のラックに立てる。すべてのスライドガラスを立てたら、ラックを数回上下して、72℃インキュベーターに戻し、30 分おく。新しい 0.2xSSC であと 2 回 30 分ずつ洗浄を行う。このステップは温度が下がらないよう気をつけてできるだけ迅速に行う。

### <蛍光検出>

TS7.5	5min	
* 1% Blocking reagent	1 hour	ブロッキング
* 1/4000 anti-FITC-HRP in 1% Blocking reagent	2~5 hours at room temp (or overnight at 4°C)	抗体 1
TNT (TS7.5, 0.05% Tween20)	10 min x 3	洗い
* TSA-Plus (DNP) 1:50:50 \$	3-10 min	TSA
TNT	5 min x 3	洗い
* 1/1000 anti-DIG-AP, 1/500 anti-DNP Alexa488 in 1% Blocking reagent	2~5 hours at room temp or overnight at 4°C	抗体 2

ラックを TS7.5 につけ平衡化したあと、1%Blocking 液でブロッキング、anti-FITC-HRP1:4000 をのせて 2~5 時間置いたあと、TNT で洗浄 TSA 処理を行う。

### <TSA 処理>

DNP Amplification Reagent を所定量の DMSO で溶解し、この Stock Solution を 1x Plus Amplification Diluent で 1/50 に希釈する。そこに等量の水を加えてメーカー指定の半分の濃度にする。スライドガラス上の反応なら半分濃度でも 10 分反応すると強すぎるくらいに出る。顆粒状のバックグラウンドがひどい時は、抗体濃度が濃すぎるか、反応しすぎなので、シグナル・ノイズ比から条件検討を行うと良い。発現量の高い遺伝子の場合、TSA による増幅の程度を控えめにすると、バックグラウンドの非常に少ないきれいな染色が可能である。なお私の経験では、TSA を薄めてもその分反応時間を長くすればほぼ変わらないデータが得られる。非常に高価な試薬なので状況に応じて節約すると良い。

TNT 洗浄後、今度は DIG 標識 RNA を AP-conjugate 抗体で認識する。TSA で増幅されたシグナルは DNP に変換されているので、蛍光標識した抗 DNP 抗体を同時に入れる。

### <DAY3>

#### <蛍光検出続き>

TNT	15 min x 3	洗い
TS8.0	10 min	
* HNPP/Fast Red TR	20-40 min	蛍光発色

洗浄後 TS8.0 で平衡化し、HNPP/FR 試薬でメーカーの指定通りに AP 活性による発光反応を行う。

HNPP/FR 試薬は Fast Red TR (粉末) を 5mg/200 $\mu$ l 水に溶かし、このストック溶液と HNPP 液がそれぞれ 1/100 になるように TS8.0 中で混合する。Fast Red は、2~4 週間は冷蔵保存化。ただし古くなると顆粒状のバックグラウンドが出やすくなる。0.2 $\mu$ m のシリンジフィルターで濾過すると良い。

スライドガラス上に HNPP/FR 試薬をのせた後、カバーガラスをかけて空気に触れないようにする。反応の進行状況はこの状態のまま蛍光顕微鏡で観察できる。長い方がよくシグナルが出るが、バックグラウンドも上がるので、適当なところで反応を止める。

#### <反応停止～カウンターステイン>

PBS-EDTA Hoechst 33342 (1 $\mu$ g/ml in PBS)	3-5 min x2 5 min	Counterstain (optional)
PBS-EDTA	3-5 min x2	
CC/マウントで封入	乾かさないうこと	封入

HNPP/FR 反応は PBS-EDTA (10mMEDTA in PBS)などで停止させる。HNPP/FR の反応産物は非常に不安定で拡散しやすい。停止後のステップは迅速に行うこと。Hoechst dye は、核を染めるために行うが、ニューロンとグリアの区別はほとんどつかない。

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。ここではできるだけ迅速に行うこと。乾燥すると diffuse しやすいので乾かないように気をつけて CC/マウント (水溶性封入剤) で封入する。もしシグナルの diffuse が疑われるときは、TNT 中でカバーガラスをはずして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。

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 Diffuse 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。

## 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 $\mu$ 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。

### <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リンフォスターゼの基質に NBT/BCIP 溶液を使えば良い。発色以降のプロトコルを記す。

### <発色>

1. スライドガラスをアルカリバッファ (TS9.5) 中で 10 分間平衡化する。
2. 待ち時間に、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. スライドガラス上に NBT/BCIP 液をのせたあとカバーグラスをかけ反応を開始する。
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. スライドガラスを PBS-EDTA 液で 5 分ずつ 2 回洗浄して、反応を停止する。
6. 最後に水で洗浄して乾燥させる。

次の手順に従って包埋する。

通常のエタノールシリーズでも可。

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		