
***In situ* Hybridization Reagents (ISHR)**

マニュアル(第 12 版)

- ISHR Starting Kit (Code No. 314-02611)
- ISHR (Code No. 316-01951)

NIPPON GENE CO., LTD.

目次

I	RNA プローブを用いた <i>in situ</i> ハイブリダイゼーション	2
II	製品の内容	5
	ISHR Starting Kit	5
	<i>In situ</i> Hybridization Reagents (ISHR)	7
	関連製品	8
III	RNA プローブの調製	9
	1. RNA プローブの調製	9
	2. RNA プローブのアルカリ加水分解	11
IV	組織の固定と切片の作製	12
	1. 固定	12
	1-1 原理	12
	1-2 固定の実際	12
	2. 切片の作製	13
	2-1 原理	13
	2-2 スライドガラスのコーティング	14
	2-3 パラフィン包埋組織切片の作製	14
V	ハイブリダイゼーション	16
	1. 前処理	16
	2. ハイブリダイゼーション	18
	3. 洗浄	20
VI	検出	21
	1. RNA プローブを DIG 標識した場合の検出	21
	1-1 抗体反応と発色反応	21
	1-2 組織染色	23
	2. RNA プローブを ³⁵ S 標識した場合の検出	24
	2-1 脱水	24
	2-2 オートラジオグラフィー	24
	2-3 現像、定着	25
	2-4 染色、検鏡	25
VII	検出例	27
VIII	トラブルシューティング	28
IX	参考文献	30

I RNAプローブを用いた *in situ* ハイブリダイゼーション

In situ ハイブリダイゼーション (ISH) 法とは、RNAまたはDNAのある“原位置 (*in situ*)”での存在をRNA-RNA、RNA-DNA、DNA-DNA ハイブリダイゼーションにより、形態像の上で検出する方法で、組織切片を用いて特定遺伝子を検出する技術を示す。現在、この方法はすでにかかなりの研究者によって使用され、重要な結果が得られてきている。特に、発生分化、形態形成の研究においては、必要不可欠な方法となっている。

ここでは、RNAプローブを用いた方法に限定するが、RNAプローブを使用すると、次のような特長がある。

- ① RNA-RNA ハイブリッドはRNA-DNA ハイブリッドに比べ、 T_m 値が高く安定である。このため高い stringency での洗浄が可能である。
- ② RNA 分解酵素 (RNase A) は二本鎖 RNA (RNA-RNA ハイブリッド) を切断しない。このため過剰プローブや非特異的に吸着したプローブを分解することにより、バックグラウンドを低下させることができる。
- ③ ハイブリダイゼーションにはアンチセンス RNA を使うが、ネガティブコントロールとしてセンス RNA を用いることができるので、結果の判定が容易である。
- ④ プローブの長さをアルカリ加水分解により短くできる。
- ⑤ 放射比活性の高いプローブの調製が可能である。このため検出感度が高い。

以下に RNA プローブを用いた ISH 法の各工程について説明する。概略を図 1 に示した。

1) 組織の固定 — mRNA を細胞内で保存する —

各細胞には様々な種類の mRNA が存在しているが、それらの mRNA の寿命は比較的短いと考えられている。タンパク質が必要な時に必要な量だけ mRNA は合成され、目的が達成されると RNA 分解酵素により速やかに分解される。現在の技術では細胞が生きたままの状態でも mRNA を検出することはできないので、細胞が死んだ状態で検出するしかない。細胞が死んでしまうと、mRNA の合成は当然止まってしまうが mRNA の分解は継続されると考えられ、したがって死んだ細胞内の mRNA は急速に分解され消失してしまう。

そのため、ISH 法を行う場合は、細胞内や組織などをなるべく自然の状態に保存することが非常に重要であり、この操作を固定と呼んでいる。細胞や組織の形態を観察するための固定法は、目的などに応じて様々な方法が開発されている。

2) 前処理

ハイブリダイゼーションを行う前に、固定した組織の前処理を行う。主な目的は、タンパク質分解酵素などを用いて結合組織などを分解しプローブの浸透性をよくするためと、プローブの非特異的な吸着を防ぐための処理である。特にタンパク質分解酵素処理時間などは、組織の種類、固定法とも関連し、ISH 法の結果を左右する重要な因子である。

3) 標識したプローブの調製

目的の mRNA を検出するためにはその mRNA と特異的にハイブリダイズする、つまり、目的の mRNA と相補的な配列を持った RNA または DNA プローブが必要である。プローブとして、

- ① 化学合成した DNA を用いるオリゴヌクレオチドプローブ
- ② DNA 合成酵素により *in vitro* で合成した DNA プローブ
- ③ RNA 合成酵素により *in vitro* で合成した RNA プローブ

の 3 種類がよく用いられている。

また、プローブの存在を可視化するためにプローブに必要なラベルを結合させる。可視化には主に次の 2 つの方法がある。

- ① 酵素抗体法または蛍光抗体法: 適当な抗原の結合した核酸を用いてプローブを標識し、その抗原に対する抗体を用いて発色または蛍光により可視化する。
- ② 放射性同位元素(RI)を用いる方法: 放射性同位元素(RI)を用いてプローブを標識し、オートラジオグラフィにより可視化する。

4) ハイブリダイゼーション

DNA の二重らせん構造は、塩基対 A=T に形成される 2 つの水素結合と塩基対 G≡C に形成される 3 つの水素結合により安定に保たれている。この二本鎖を一本鎖にする方法の一つとして、熱変性がある。二重らせん DNA 溶液の温度を高くしながら DNA 溶液の 260 nm の吸光度 A_{260} を測定すると、次第に A_{260} は高くなる。これは DNA の二重らせんが壊れ一本鎖になるため、この曲線を DNA の融解曲線と呼んでいる。この現象は、らせんが消失し塩基間の相互作用が少なくなるため、塩基の光吸収の効率が変化（深色効果）し、各塩基の分子吸光係数が高くなるために生じる。温度が低い時の DNA をヘリックス 100%とし、高温での吸光度が一定になる状態をヘリックス 0%と仮定すると、ヘリックス 50%になる温度、融解温度 (T_m) を決定することができる。

T_m は二重らせんの安定度の目安になる。非常に安定ならせんであれば T_m は 80~90°Cになる。逆に不安定であれば 30~40°Cになる。 T_m は DNA 溶液のイオン強度（塩濃度）や組成にも依存し、また、GC 塩基対の含量、DNA の長さ、DNA の塩基対のミスマッチなどにより変化する。

T_m の温度では全体の 50%ほど二重らせんが形成されていることになる。ハイブリダイゼーションの温度 (T_h) は、 T_m から 5~10°C低い温度で行う。どの程度の塩基対のマッチまで許容するかを stringency という。($T_m - 5$)°C でハイブリダイズさせると、stringency が高くなり、完全マッチした DNA-DNA しかハイブリッドを形成しない。既知の塩基配列を持った一本鎖の mRNA が、高い stringency の条件では相補的な配列を持つ DNA あるいは RNA プローブに特異的に結合することを利用して、多くの DNA あるいは RNA の中から、目的の DNA あるいは RNA を識別し、検出することができる。しかし、ハイブリダイズする温度を ($T_m - 20$)°C と低くすると stringency が低くなり、ミスマッチを持ったハイブリッドも形成される。

ISH 法では、RNA プローブを使用する場合、50%ホルムアミド中 50°C で 12~14 時間ハイブリダイゼーションを行うとほぼ良い結果が得られる。もし、プローブとして 50 塩基以下の DNA を用いる場合などは、低 stringency の条件でハイブリダイゼーションを行う。

5) 洗浄

非特異的に結合したプローブを除去するために組織切片を洗浄する。洗浄の条件を厳しくするとバックグラウンドが低下するが、同時にシグナルも弱くなる。RNA プローブを用いた場合は、RNase 処理によりバックグラウンドを低下させることができるが、同時にシグナルも弱くなるので、いずれにしても最適な条件を検討する必要がある。

6) プローブの検出

① 酵素抗体法

標識プローブ単独では発色することができないため、プローブの中に取り込まれている抗原に対する抗体を用いて検出を行う。検出に用いる一次抗体には、通常の抗体とは異なりアルカリホスファターゼ (ALP) などの酵素が結合 (conjugate) している。一次抗体に ALP が結合している場合、X-りん酸 (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphatase : BCIP) などを用いると、ALP が X-りん酸の結合を切断することにより X が遊離し、発色がおこる。この発色により検出することが可能となる。蛍光色素の場合には、蛍光顕微鏡で検出することが可能である。

② 放射性同位元素 (RI) を用いる方法

ISH 法においては RI として ^{35}S (または ^{33}P) 標識された核酸を用いてプローブを合成する。RI は β 線を放射しているので、オートラジオグラフィ用の乳剤を用いて検出することができる。

7) 観察と記録

組織の細胞を色素で染色することにより、形態学的な観察ができる。結果を顕微鏡で観察し、さらに写真として記録する。

RNA プローブを用いた ISH 法は、どのような組織にも広く分布しかつ非常に安定な RNase により、組織切片の mRNA だけでなく RNA プローブ自身も分解されやすく、そのために注意深い実験操作が要求される。さらに、形態学的手法に加えて DNA や RNA を取り扱う分子生物学的な手法も必要である。そこで、ISH を最小限のステップで満足な結果が得られるよう工程を改良し、ISH 用専用試薬として、ISHR Starting Kit [Code No. 314-02611] と *In situ* Hybridization Reagents (ISHR) [Code No. 316-01951] の 2 種類を用意した。

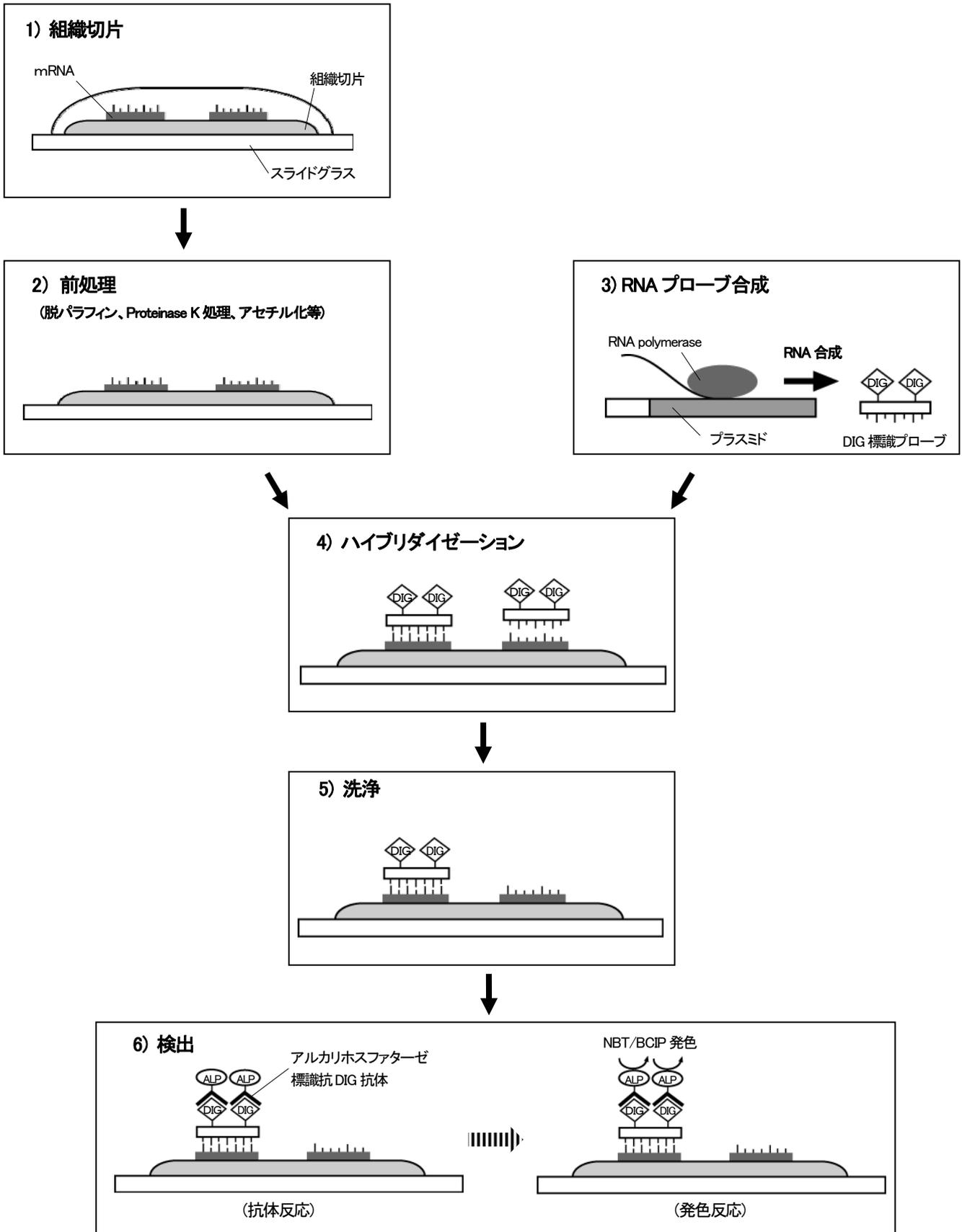


図 1. RNA プローブを用いた ISH 法の工程

II 製品の内容

ISHR Starting Kit [Code No. 314-02611] スライドグラス～20枚×2回分*

ISHR Starting Kit は、初めて *in situ* hybridization (ISH) を行う研究者のためのパラフィン包埋組織切片専用の練習用キットである。このキットには、RNA プローブ調製用試薬、コントロール用組織切片、組織切片の前処理（脱パラフィン）からハイブリダイゼーション及び洗浄までの試薬が含まれている。ポジティブコントロールとして、RNA プローブを用いてマウス（雄）アダルト顎下腺の組織切片上でマウス神経成長因子（NGF）遺伝子の mRNA を検出する系を使用している。NGF mRNA は顎下腺の顆粒導管に特異的に発現するので、結果の判断が容易である。

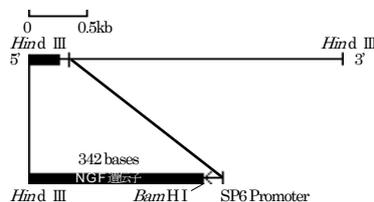
* 切片のサイズや数によって必要な試薬量が変わります。

<組織切片および RNA プローブ調製用試薬>

- | | |
|---|-----------|
| <input type="checkbox"/> コントロール用組織切片スライドグラス | 2～10℃保存 |
| マウス（雄）アダルト顎下腺 | 4枚 |
| <input type="checkbox"/> コントロールプローブ調製用鑄型 DNA(直鎖状) | -20℃保存 |
| マウス神経成長因子(NGF)遺伝子 (1 μg/μl) | 各 2 μl×1本 |

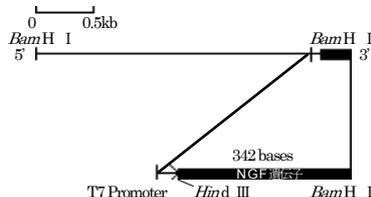
アンチセンス (AS) プローブ用

プラスミド pAM18 に組み込まれているものを
Hind III により直鎖状にしたもの



センス (S) プローブ用

プラスミド pAM18 に組み込まれているものを
Bam HI により直鎖状にしたもの



- | | |
|--|-----------|
| <input type="checkbox"/> RNA Synthesis Set | -20℃保存 |
| 5 × RNA Polymerase Buffer | 20 μl×1本 |
| 250 mM NaCl | 10 μl×1本 |
| 10 mM rATP | 5 μl×1本 |
| 10 mM rGTP | 5 μl×1本 |
| 10 mM rCTP | 5 μl×1本 |
| 10 mM rUTP | 5 μl×1本 |
| RNase Inhibitor | 5 μl×1本 |
| SP6 RNA Polymerase | 5 μl×1本 |
| T3 RNA Polymerase | 5 μl×1本 |
| T7 RNA Polymerase | 5 μl×1本 |
| Deoxyribonuclease (RT Grade) | 5 μl×1本 |
| RNase free Water | 500 μl×1本 |
| <input type="checkbox"/> アルカリ加水分解バッファー | 室温保存 |
| 0.1 M 炭酸ナトリウム (pH 10.2) | 800 μl×1本 |
| <input type="checkbox"/> Ethachinmate | 2～10℃保存 |
| Ethachinmate | 10 μl×1本 |
| 3M Sodium Acetate (pH 5.2) | 100 μl×1本 |

< *in situ* ハイブリダイゼーション用試薬 >

試薬名		組成	容量	保存
<input type="checkbox"/> ISHR 1	PBS Buffer	0.1 M NaCl 10 mM リン酸ナトリウム(pH 7.4)	800 ml × 2 本	室温保存
<input type="checkbox"/> ISHR 2	PBS(Glycine) Buffer	0.1 M NaCl 10 mM リン酸ナトリウム(pH 7.4) 2 mg/ml Glycine	400 ml × 1 本	室温保存
<input type="checkbox"/> ISHR 3	Acetylation Buffer	0.1 M Triethanolamine (pH 8.0)	800 ml × 1 本	室温保存
<input type="checkbox"/> ISHR 4	Acetic anhydride	無水酢酸	1 ml × 2 本	室温遮光保存 劇物 特麻原
<input type="checkbox"/> ISHR 5	4 × SSC	0.6 M NaCl 0.06 M Sodium citrate	1 L × 2 本	室温保存
<input type="checkbox"/> ISHR 6	Proteinase K Solution	10 mg/ml Proteinase K	200 μl × 1 本	-20°C保存
<input type="checkbox"/> ISHR 7	Hybridization Buffer	50% Formamide 2 × SSC 1 μg/μl tRNA 1 μg/μl Salmon sperm DNA, 1 μg/μl BSA 10% Dextran Sulfate	93 μl × 8 本	-20°C保存
<input type="checkbox"/> ISHR 8	1.2 M DTT Solution	1.2 M DTT	100 μl × 1 本	-20°C保存
<input type="checkbox"/> ISHR 9	NTE Buffer	0.5 M NaCl 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) 1 mM EDTA	800 ml × 1 本	室温保存
<input type="checkbox"/> ISHR 10	RNase A Solution	10 mg/ml RNase A	0.4 ml × 2 本	-20°C保存
<input type="checkbox"/> ISHR 11	0.1 × SSC	15 mM NaCl 1.5 mM Sodium citrate	600 ml × 2 本	室温保存

◇ ISHR Starting Kit には、以下の試薬は含まれておりません。

ジゴキシゲニン(DIG)標識及び検出用試薬、固定用試薬、組織包埋用試薬、スライドコーティング用試薬、エタノール、キシレン、ホルムアミド、染色試薬、オートラジオグラフィ用試薬

< 略字記号 >

劇物: 毒物及び劇物取締法で劇物に指定されています。

特麻原: 特定麻薬原料及び向精神薬原料に指定されています。

In situ Hybridization Reagents (ISHR) [Code No. 316-01951] スライドガラス～20枚×5回分*

In situ Hybridization Reagents (ISHR) は組織切片の脱パラフィンからハイブリダイゼーション及び洗浄までに必要な試薬のみが含まれている。試薬の容量が多いので、多数の組織切片を処理する場合に便利である。

*切片のサイズや数によって必要な試薬量が変わります。不足分については単品(関連製品 p.8 参照)でご購入ください。

試薬名		組成	容量	保存
<input type="checkbox"/> ISHR 1	PBS Buffer	0.1 M NaCl 10 mM リン酸ナトリウム(pH 7.4)	1 L×4 本	室温保存
<input type="checkbox"/> ISHR 2	PBS(Glycine) Buffer	0.1 M NaCl 10 mM リン酸ナトリウム(pH 7.4) 2 mg/ml Glycine	1 L×1 本	室温保存
<input type="checkbox"/> ISHR 3	Acetylation Buffer	0.1 M Triethanolamine(pH 8.0)	1 L×2	室温保存
<input type="checkbox"/> ISHR 4	Acetic anhydride	無水酢酸	1 ml×5 本	室温遮光保存 劇物 特麻原
<input type="checkbox"/> ISHR 5	4 × SSC	0.6 M NaCl 0.06 M Sodium citrate	1 L×5 本	室温保存
<input type="checkbox"/> ISHR 6	Proteinase K	Proteinase K (Powder) 溶解用滅菌水	5 mg×1 本 500 μl×1 本	2～10℃保存
<input type="checkbox"/> ISHR 7	Hybridization Buffer	50% Formamide 2 × SSC 1 μg/μl tRNA 1 μg/μl Salmon sperm DNA, 1 μg/μl BSA 10% Dextran Sulfate	465 μl×5 本	-20℃保存
<input type="checkbox"/> ISHR 8	Hybridization buffer 用 DTT	DTT (Powder) 溶解用滅菌水	93 mg×1 本 500 μl×1 本	2～10℃保存
<input type="checkbox"/> ISHR 9	NTE Buffer	0.5 M NaCl 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) 1 mM EDTA	1 L×2 本	室温保存
<input type="checkbox"/> ISHR10	RNase A Solution	10 mg/ml RNase A	0.4 ml×5 本	-20℃保存
<input type="checkbox"/> ISHR11	0.1 × SSC	15 mM NaCl 1.5 mM Sodium citrate	1 L×3 本	室温保存

◇In situ Hybridization Reagents には、以下の試薬は含まれておりません。

ジゴキシゲニン(DIG)標識及び検出用試薬、RNA プローブ調製用試薬、コントロール用組織切片、固定用試薬、組織包埋用試薬、スライドコーティング用試薬、エタノール、キシレン、ホルムアミド、染色試薬、オートラジオグラフィー用試薬

<略字記号>

劇物: 毒物及び劇物取締法で劇物に指定されています。

特麻原: 特定麻薬原料及び向精神薬原料に指定されています。

関連製品

製品名	容量	Code No.
ISHR 1 PBS Buffer	1 L×1 本	311-02741
ISHR 2 PBS (Glycine) Buffer	1 L×1 本	318-02751
ISHR 3 Acetylation Buffer	1 L×1 本	315-02761
ISHR 4 Acetic anhydride 劇物 特麻原	1 ml×5 本	312-02771
ISHR 5 4 × SSC	1 L×1 本	319-02781
ISHR 7 Hybridization Buffer	465 μl×5 本	316-02791
ISHR 8 Hybridization Buffer 用 DTT	93 mg×1 本	319-02801
ISHR 9 NTE Buffer	1 L×1 本	316-02811
ISHR 10 RNase A Solution	0.4 ml×5 本	313-02821
ISHR 11 0.1 × SSC	1 L×1 本	310-02831
Ethachinmate (3 M Sodium Acetate 添付)	0.2 ml	312-01791

<略字記号>

劇物: 毒物及び劇物取締法で劇物に指定されています。

特麻原: 特定麻薬原料及び向精神薬原料に指定されています。

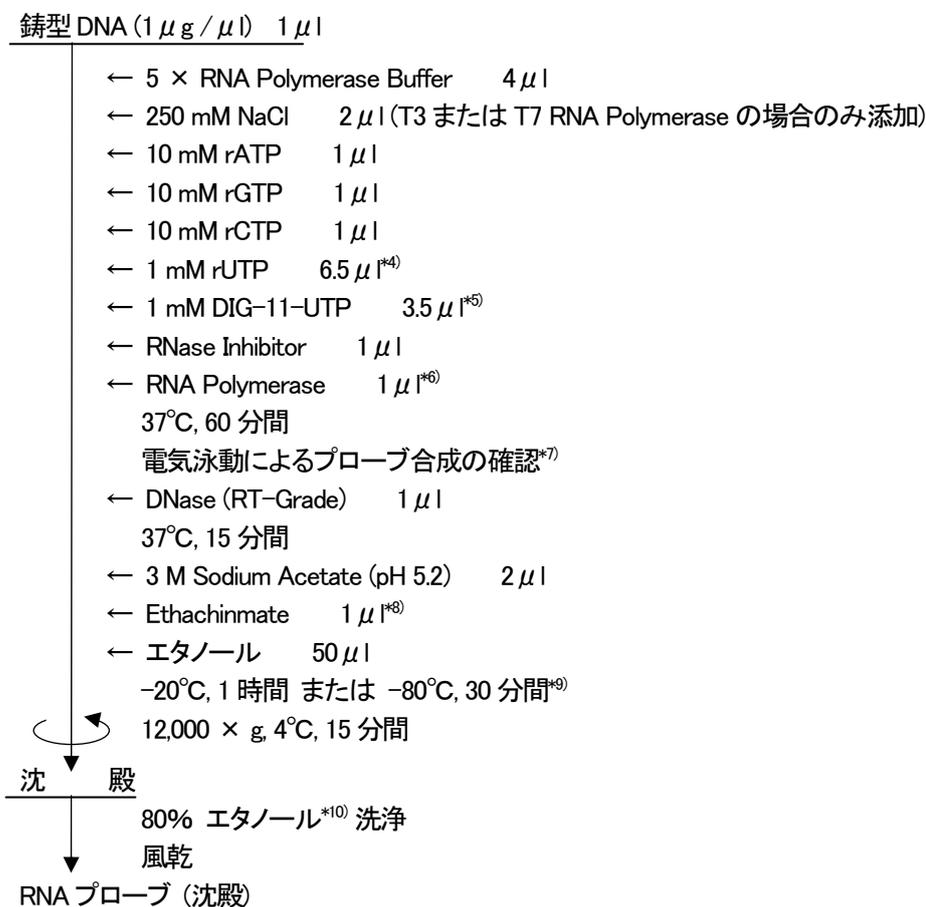
Ⅲ RNA プローブの調製

*使用する器具、試薬は、RNase free のものを使用する。

(滅菌を行う場合:オートクレーブ 121°C, 40 分以上または乾熱滅菌 200°C, 4 時間以上)

1. RNA プローブの調製

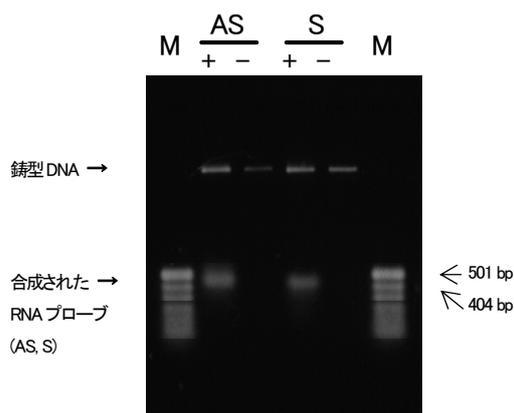
- ① 実験者が用意したアンチセンス(AS) およびセンス(S) RNA プローブの調製に必要な鋳型 DNA^{*1)} を 5'突出末端を形成する制限酵素^{*2)} で直鎖状にする。
コントロール用鋳型 DNA は既に直鎖状になっているので、この操作は必要ない。
- ② ①で調製した直鎖状鋳型 DNA と、添付のマウス神経成長因子 (NGF) アンチセンス (AS) 用およびセンス (S)用の直鎖状鋳型 DNA を用いて、RNA Synthesis Set^{*3)} により以下のフローチャートに従ってそれぞれの RNA プローブを調製する。



- ③ ②で合成された RNA プローブの長さが 500 bp 以下の場合は、RNA Synthesis Set に添付している RNase free Water 20 μ l で溶解する^{*11)}。500 bp 以上の場合は、RNase free Water で溶解せずに「2. RNA プローブのアルカリ加水分解」へ進む。

- *1) RNA プローブを合成する際に鋳型として使用するプラスミドは、塩化セシウムを用いた密度勾配による精製もしくはカラムを用いた簡便法による精製を行ったものを使用する。アルカリ-SDS 法により調製したプラスミドは、genome DNA の混入により、polymerase 反応が阻害される場合があるので避けたほうがよい。
- *2) 3'突出末端または、平滑末端を形成する酵素(*Apa* I, *Kpn* I, *Pst* I, *Sac* I, *Sph* I など)で直鎖化すると不要な配列を転写することがある。
- *3) RNA Synthesis Set は *In situ* Hybridization Reagents (Code No. 316-01951) には含まれていない。
- *4) 製品に含まれている 10 mM rUTP を添付の RNase free Water で 10 倍に希釈(1 mM)して使用する。³⁵S 標識の場合は rUTP を加えなくてよい。
- *5) DIG-11-UTP は製品に含まれていない。ロシュ・ダイアグノスティクス社製 DIG-11-UTP は濃度が 10 mM なので RNase free Water で 10 倍に希釈(1 mM)して使用する。DIG 標識した RNA をフェノール抽出した場合、DIG 標識した RNA の部分的なロス(約 20%)が起こる。この DIG 標識 RNA のフェノール相への分離は塩を加えることによってさらに増加する。³⁵S 標識の場合は [α -³⁵S]rUTP 10 μ l (400~800 Ci/mmol) を加える。
- *6) 合成するプローブに適したポリメラーゼを使用する。製品添付の NGF-AS の場合は SP6 RNA Polymerase を、NGF-S の場合は T7 RNA Polymerase を用いる。プローブの合成量が少ない場合は、添加するポリメラーゼの量を増加すると改善されることがある。
- *7) インキュベート後、チューブを氷上に移し反応を止め、チューブから 1 μ l とり、電気泳動により RNA が合成されていることを確認する。

RNA プローブの電気泳動結果の例



サンプルは各レーン 2 μ l ずつアプライした。

DIG で標識された RNA プローブは、電気泳動した場合に予想されるサイズより大きいサイズで現れる。

AS:コントロールプローブ用鋳型 DNA(アンチセンス用)を用いて合成したアンチセンス RNA プローブ

S :コントロールプローブ用鋳型 DNA(センス用)を用いて合成したセンス RNA プローブ

+ : RNA polymerase 添加

- : RNA polymerase 不添加

M : Marker 11(pUC19/*Msp* I digest) 0.5 μ g

2% Agarose S ミュービッドゲル 50 V

- *8) Ethachinmate は核酸(DNA 及び RNA)をエタノールまたはイソプロパノール沈殿させる際に使用するキャリアーである。Ethachinmate を加えた後ボルテックスを十分行い、試料中で均一にすることにより、微量の RNA でも定量的に回収することができる。Ethachinmate を使用する場合、チューブの材質によって(例えば、エッペンドルフ社の Safe-Lock tube)沈殿がはがれやすくなることがあるので注意する。
- *9) Ethachinmate を加えた場合には、冷却せずに遠心できる。収量が微量であると予想される場合には、冷却を行った方がよい。
- *10) 80%エタノールを調製する際には d.d.H₂O(RNase free)を使用する。80%エタノールをチューブ壁をすすぐように静かに加えた後、12,000 × g, 4°C, 5 分間 遠心して上清を取り除く。
- *11) 沈殿が溶けにくい場合には、時々ボルテックスしながら 37°C に加温する。

2. RNA プローブのアルカリ加水分解

プローブの組織切片への浸透効率を上げるため、RNA プローブの長さを 150 bases 程度に分解する。

- ① 「1. RNA プローブの調製」で調製した RNA プローブ(沈殿)にアルカリ加水分解バッファーを 200 μ l 加え、タッチミキサーで攪拌する。
- ② NGF-AS、NGF-S プローブを 60°C で 34 分インキュベートする。
実験者が用意した AS プローブおよび S プローブについては、インキュベート時間 (T) を下記の計算式または表より求め、60°C でインキュベートする。

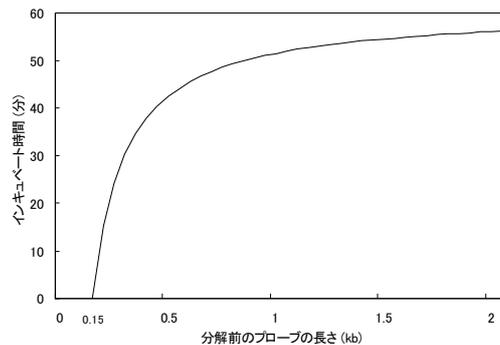
$$\text{インキュベート時間 (T)} = \frac{L_i - L_f}{k \times L_i \times L_f}$$

L_i = 分解前の (合成された) RNA プローブの長さ (kb)

L_f = 分解後の RNA プローブの長さ (kb)

$k = 0.11$ (cuts / kb / min.)

分解前のプローブの長さ (kb)	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	1.0	1.5	2.0
インキュベート時間 (分)	15	30	38	42	46	48	49	52	55	56



例) 添付の NGF-AS または NGF-S プローブの場合

鋳型 DNA のマウス NGF 遺伝子の長さが 342 bases なので、 $L_i = 0.342$ (kb)、最終的に約 150 base にしたいので $L_f = 0.150$ (kb)

$$\text{インキュベート時間 (T)} = \frac{L_i - L_f}{0.11 \times L_i \times L_f} = \frac{0.342 - 0.150}{0.11 \times 0.342 \times 0.150} = 34.02 \approx 34 \text{ 分}$$

- ③ 酢酸 1 μ l (終濃度 0.5%) を加え、反応を止める。
- ④ Ethachinmate に添付してある 3 M Sodium Acetate (pH 5.2) を 20 μ l 加え、タッチミキサーで攪拌する。
- ⑤ エタノールを 500 μ l 加え、転倒混和した後、-20°C で 1 時間または -80°C で 30 分以上放置する。
- ⑥ 12,000 \times g, 4°C, 20 分遠心後、上清のエタノールを捨てる。
- ⑦ 80%エタノールを 1 ml 加え、数回転倒混和した後、12,000 \times g, 4°C, 5 分遠心する。
- ⑧ 上清の 80%エタノールを除去した後、沈殿を風乾する。この時、乾燥しすぎると、沈殿が溶けにくくなるので注意する。
- ⑨ 沈殿を RNA Synthesis Set に添付している RNase free Water 20 μ l に溶かす*11)。ここで約 1 週間-80°C 保存できる。RI ラベルの場合は保存できないため、用時調製する。

*11) 沈殿が溶けにくい場合には、時々ボルテックスしながら 37°C に加温する。

IV 組織の固定と切片の作製

ここで使用する試薬は、ISHR Starting Kit 及び *In situ* Hybridization Reagents には含まれていない。

*使用する器具、試薬は、RNase free のものを使用する。

(滅菌を行う場合:オートクレーブ 121°C, 40 分以上または乾熱滅菌 200°C, 4 時間以上)

1. 固定

1-1 原理

細胞や組織をできるだけ生きたままの状態を観察するためには、固定を行わなければならない。組織学においては様々な固定法が知られているが、固定法の一つにアルデヒドを用いてタンパク質間の架橋により固定する方法がある。ISH 法において、初めは 4%パラホルムアルデヒドによる固定を行うとよい。

固定は、強すぎるとプローブや抗体の浸透性が悪くなり、弱すぎると細胞や組織が処理の間に壊れてしまうので、研究対象に応じて最適条件を検討しなければならない。ISH 法の場合はさらに、組織中の mRNA などの転写産物を検出する必要があるため、組織中の転写産物が分解されないように固定を行う必要がある。また、RNA の分解が生じないようにすばやく固定することが非常に重要である。動物の血流が停止してからすぐに RNA の分解が始まると考えておいた方がよい。したがって、動物実験であれば、動物を灌流固定することを勧める。ヒト組織の場合は、できるだけ早く固定する。

1-2 固定の実際

組織固定は ISH 法において重要なポイントである。シグナルが検出できない場合、固定に原因があることが多い。固定法については、別冊実験医学 ザ・プロトコールシリーズ「免疫染色・*in situ* ハイブリダイゼーション」(羊土社) 第3章形態学的基礎技術 固定法に詳細が記されているので参考にするとよい。また、灌流固定を行う場合には、一度専門家の技術を見学することを勧める。

<試薬>

ジエチルエーテル

4% パラホルムアルデヒド

4%パラホルムアルデヒドの調製方法：使用直前に、20%パラホルムアルデヒドを0.1 M リン酸ナトリウム (pH 7.4) で4%に希釈する。

20%パラホルムアルデヒド 10 ml *

0.1 M リン酸ナトリウム (pH 7.4) 40 ml **

* 20%パラホルムアルデヒド: パラホルムアルデヒド 10 g に d.d.H₂O を加えて 40 ml 程度にする。10N NaOH を 100 μl 加え、45 分から 1 時間の間、50~60°C で温めながら溶かす。その後氷冷し、d.d.H₂O で 50 ml にメスアップする。パラホルムアルデヒドはドラフト内で量り、調製後 1 週間以内に使用する。冷蔵保存。NaOH は新しいものを使用する。溶液調製、保存の際にはガラス製の容器は使用しない。

** 0.1 M リン酸ナトリウム (pH 7.4): A 液 23 ml, B 液 77 ml および d.d.H₂O 100 ml を加えて調製する。

A 液 : 0.2 M NaH₂PO₄ (NaH₂PO₄·H₂O 27.6 g/l)

B 液 : 0.2 M Na₂HPO₄ (Na₂HPO₄·2H₂O 35.6 g/l)

PBS Buffer

組成: 0.1 M NaCl, 10 mM リン酸ナトリウム (pH 7.4)

ISHR1 PBS Buffer (Code No. 311-02741) を使用できるが、固定操作で使用する分は ISHR Starting Kit に含まれていない。

<器具>

23G 翼状針

ピンセット

ハサミ(動物実験用など)

1) アダルトマウスの灌流固定

- ① 動物を空瓶の中でジエチルエーテルにより麻酔する。
- ② 動物が動かなくなるまで待つ (約 2 分間)。
- ③ 頸骨を脱臼する。
- ④ 腹部に 70% EtOH をきりふきでふきつける。
- ⑤ 腹部を肋骨の両側から内胸動脈を切らないように縦に切開し、肋骨を裏返して心臓を露出させる。
- ⑥ 右心耳にハサミを入れる。
- ⑦ 50 ml の注射筒に 4% パラホルムアルデヒドを入れ、23G 翼状針を付け、左心室より灌流固定する。うまく固定できれば、四肢は硬直し、目や肝臓の色が変化する。
- ⑧ 灌流固定の後、組織を取り出す。組織のまわりについている余分な脂肪膜をピンセットなどで除去し、3 mm くらいのブロックにする。組織によって(例えば皮膚など)は、必ずしも灌流固定の必要はなく、浸透固定で十分である。
- ⑨ すばやく目的組織を摘出し、大きい組織であればさらになるべく薄い切片にし、氷冷した固定液に入れ、そのまま 3 時間放置する。固定時間は材料の種類と大きさや温度に関係する。2×3×3 mm 大ならば 3~5 時間でよい。3×5×5 mm 大のもので一晩を標準とする。
- ⑩ 滅菌済 PBS Buffer で 5 分間、3 回洗浄する。組織 1 g に対して 1 回あたり 10~20 ml で洗浄する。この操作は過剰の固定液を除去するのに必要である。

2) 灌流できない試料の場合

ヒトバイオプシー (biopsy) の場合、組織を小さく切り (3~5 mm 厚)、できるだけ早く組織の 10 倍以上の量の固定液に浸し、氷上(または 4°C)で 2~3 時間固定する。固定時間は組織の大きさ、種類により多少異なるので調節する。手術により得られる試料の場合、遅くても切除後数分以内に固定しなければならない。

<組織片を切り出す際の注意>

- ・ mRNA が分解しないように、組織片を 1 秒でも早く固定液に入れる。
- ・ 固定液が均一に浸透し、組織が均一に固定されるように、組織片をなるべく小さな切片(3 mm 以下)にする。
- ・ 組織の方向を考える。組織を切り出す際には、あらかじめその組織の形態学を勉強し、どの方向に切れば、後で観察しやすいかを考えておく。
- ・ 目的の組織の周囲にそれ以外の組織などが付いていると、後の処理や観察において邪魔になる場合があるので、目的の組織だけにする。
- ・ 組織片をピンセットで強くつまんだり、激しく振とうしたりすると、組織が傷むので、極力丁寧に扱う。

<固定組織の整理>

- ・ 種類の異なる組織を一度にいくつも処理する場合には、目印を付けなければならない。方法はいろいろあるが、組織の種類などを鉛筆で紙に記入しておき、組織片を固定液に入れる時に、紙片も入れておくとよい。

2. 切片の作製

2-1 原理

目的とする mRNA がどのような器官・組織・細胞に存在しているかを知るためには、固定した組織・胚を薄切りにする必要がある。そこで、パラフィン包埋するかあるいは OCT コンパウンドの中で凍結して、ブロックを包埋剤ごと薄切りにする。

パラフィン切片及び凍結切片作製において、包埋を行う際に包埋剤と試料の堅さがなるべく等しいことが重要である。包埋剤と試料の堅さが極端に異なる場合、薄切りしたときに試料だけ離脱することがある。

2-2 スライドガラスのコーティング

組織切片を作製する前に、切片を貼り付けるスライドガラスをコーティングしておかなければならない。以下にコーティング方法を示す。コーティングの材料は poly-L-lysine、3-aminopropyltriethoxysilane (APS) のどちらでも使用できる。また、コーティング済みのスライドガラスが市販されており(マツナミ社やシグマ社)、これらを購入してもよい。

<試薬>

- poly-L-lysine または 3-aminopropyltriethoxysilane (APS)
- d.d.H₂O (RNase free)
- エタノール (APS コーティングの場合のみ)

<器具>

- スライドガラスホルダー
- 染色バット

1) poly-L-lysine コーティング

- ① 新品のスライドガラスを洗浄し、ホルダーにセットして乾燥させる。
- ② d.d.H₂O (RNase free) を用いて 0.05% poly-L-lysine 水溶液を調製し、①を 30 分間浸す。
- ③ 空気中で乾燥させる。数カ月間、室温にて保存可能である。

2) 3-aminopropyltriethoxysilane (APS) コーティング

- ① 新品のスライドガラスを洗浄し、ホルダーにセットして乾燥させる。
- ② APS を 2% になるようにアセトンに溶かし、①を 5 分浸す。
- ③ スライドガラスを d.d.H₂O (RNase free) に 5 分浸す。
- ④ スライドガラスをエタノールに 5 分浸す。
- ⑤ 清潔なインキュベーター中にて 37°C で約 1 時間乾燥させる。
4°C で保存し、1 カ月以内に使用する。

2-3 パラフィン包埋組織切片の作製

切片の作製は、できればルーチンに行っている研究室などのシステムを使用することをお勧めする。以下は、そのようなシステムがない場合に最低限の設備で行う方法である。

自動包埋装置を使用する場合は数時間～24 時間にセットする。

1) 脱水～包埋

<試薬>

- エタノール(試薬特級)
- キシレン
- パラフィン

<器具>

- ガラス製サンプル瓶^{*1)}
*1) ①～③の操作に使用する。試料の 20～50 倍容積のガラス製サンプル瓶が適している。プラスチックチューブでもよいが、ガラス製は透徹した時に試料が透明になるのが肉眼でわかるので便利である。
- パラフィン用容器
- ピンセットまたは薬さじ

① 以下の要領で振とうしながら脱水する。^{*2)}

- | | | |
|--------------|----|--------------|
| (1) 50%エタノール | 氷上 | 15 分間 振とう |
| (2) 70%エタノール | 氷上 | 15 分間 振とう |
| (3) 80%エタノール | 氷上 | 15 分間 振とう |
| (4) 90%エタノール | 氷上 | 15 分間 振とう |
| (5) 95%エタノール | 氷上 | 15 分間 振とう |
| (6) エタノール | 室温 | 15~30 分間 振とう |
| (7) エタノール | 室温 | 15~30 分間 振とう |
| (8) エタノール | 室温 | 15 分間~一晩振とう |

*2) 脱水が不十分だと最終的に試料内の水分がパラフィンに置換できず、良い切片を作製できない。また、切片がはがれる原因となる。組織に応じて時間を調節する。大きな組織で液の浸透性の悪いものは時間を長くする。

② 以下の要領で透徹する。^{*3)}

- | | | |
|-----------|----|--------------|
| (9) キシレン | 室温 | 15~30 分間 振とう |
| (10) キシレン | 室温 | 15~30 分間 振とう |
| (11) キシレン | 室温 | 15~30 分間 振とう |

*3) 組織に応じて時間を調節する。組織に均一な透明感が出たら、脱水が十分に行われた目安である。

③ 以下の要領でパラフィンに置換する。パラフィンはパラフィン溶融器を 62°C に設定し、溶かしておく。

組織を移す際には、ピンセット、薬さじなどを使用する。

- | | | |
|-----------------------|------|------|
| (12) キシレン:パラフィン (2:1) | 62°C | 1 時間 |
| (13) パラフィン | 62°C | 1 時間 |
| (14) パラフィン | 62°C | 一晩 |

④ 62°C のパラフィンで包埋する。新しいパラフィン液をパラフィン用容器^{*4)} に注ぎ、パラフィンに置換した組織を必要に応じて方向を定めて包埋し、固化させた後、4°C で保存する。

*4) 専用の容器がない場合、直方体のもの (OD 測定用のキュベットなど) を型にして、アルミホイルまたは紙で器を作製することができる。

2) 切片の作製

① パラフィン包埋用容器から組織を包埋したパラフィンブロックを取り出し、切片を作製する方向を考え、必要に応じてカミソリなどでトリミングする。

② トリミング時に出た屑パラフィンを薬さじの上に乗せ、アルコールランプの火にかざして融解させ 1 cm 角の木製ブロックの上に注ぐ。その上に底面を熱した薬さじで溶かしたパラフィンブロックを置き、適切な方向になるように注意しながらパラフィンブロックを木製ブロックに接着させる。^{*5)}

*5) 専用のパラフィン包埋用容器を使用した場合には、試料ブロックを木製ブロックに接着せず、そのまま③のマイクロームに取り付けることができる。

③ ブロックが完全に冷めたら、マイクロームの試料台に取り付ける。

④ 必要な部分が出てくるまで、厚めの切片 (20 μm 位) を切り、必要に応じて光学顕微鏡で方向や傷の有無を確認し、試料の方向合わせをしておく。

⑤ 5~10 μm の切片を切り、適当な長さの連続切片のリボンを作っていく。

⑥ 必要に応じてリボンをメスで切って、いくつかの切片を含む断片にする。コーティング済みのスライドグラスに滅菌済みのパストツールピペットなどを用いて滅菌蒸留水 0.5 ml を滴下した上に、ピンセットを使って、切片を表裏や順番に注意しながら置き、スライドグラスをパラフィン伸展器^{*6)} の上に置いて、切片が伸展するのを待つ。

*6) パラフィン伸展器の温度が高すぎると、切片に亀裂が入り、切片があつという間にパラフィンとともにバラバラになってしまうので注意する。

⑦ 切片が十分伸展したら、スライドグラスを傾けながら、余分な水をディスプレイ注射器 (1 ml 針付) で吸い取る。^{*7)}

*7) 切片とスライドグラスの間に水が残ると、そこだけ切片が貼り付かずはがれる原因となる。

⑧ さらにパラフィン伸展器の上で数時間乾燥させ、一晩放置しておく。スライドグラスに貼り付けた切片は室温で長期にわたって保存できる。

V ハイブリダイゼーション

1. 前処理

パラフィン包埋組織切片の場合のプロトコールです。凍結組織切片については、書籍等をご参考にしてください。

- * 使用する器具、試薬は、RNase free のものを使用する（滅菌を行う場合：オートクレーブ 121°C, 40 分以上または乾熱滅菌 200°C, 4 時間以上）。また、器具はできるだけ専用のものを用いる。
- * 脱パラフィンからハイブリダイゼーションまでは、RNase の混入を防ぐため、必ず使い捨ての手袋を着用する。また、スライドグラスやホルダーを扱う際にはピンセットを使用し、絶対に素手で触れないようにする。
- * 実験台を使用前に清潔にしておく。

<試薬> (スライドグラス~20 枚分 / 1 回分)

<input type="checkbox"/> ISHR 1	PBS Buffer	800 ml
<input type="checkbox"/> ISHR 2	PBS (Glycine) Buffer	200 ml
<input type="checkbox"/> ISHR 3	Acetylation Buffer	400 ml
<input type="checkbox"/> ISHR 4	Acetic anhydride	1 ml
<input type="checkbox"/> ISHR 5	4 × SSC	850 ml
<input type="checkbox"/> ISHR 6	Proteinase K Solution (10 mg/ml) ^{*1)}	
<input type="checkbox"/> エタノール		1,180 ml
<input type="checkbox"/> キシレン		600 ml
<input type="checkbox"/> ホルムアミド		450 ml
<input type="checkbox"/> d.d.H ₂ O (RNase free)		220 ml

*1) *In situ* Hybridization Reagents では、Proteinase K (Powder) 5mg および溶解用滅菌水 500 μl が含まれている。使用前に Proteinase K (Powder) 5 mg 入りのチューブに添付の溶解用滅菌水 500 μl を加えて溶解する（濃度 10 mg/ml）。溶解後は-20°Cで保存する。

<RNA プローブ>

- 「Ⅲ RNA プローブの調製」で調製したもの
マウス神経成長因子アンチセンス RNA プローブ (NGF-AS プローブ)
マウス神経成長因子センス RNA プローブ (NGF-S プローブ)
実験者が用意したアンチセンス RNA プローブ (AS プローブ)
実験者が用意したセンス RNA プローブ (S プローブ)

<組織切片>

- マウス (雄) アダルト顎下腺組織切片 (添付) 2 枚
- 「Ⅳ 組織の固定と切片の作製」で調製したもの (用意できる場合)
 - ・目的遺伝子が発現していると思われる組織切片 (未知の組織切片)
 - ・目的遺伝子の発現部位が既に明らかである組織切片 (ポジティブコントロール用組織切片)
 - ・目的遺伝子が発現しないことが明らかである組織切片 (ネガティブコントロール用組織切片)

<器具>

- | | | |
|---|------------------------------------|--|
| <input type="checkbox"/> 使い捨て手袋 | <input type="checkbox"/> テフロン攪拌子 | <input type="checkbox"/> パラフィルム |
| <input type="checkbox"/> ピンセット | <input type="checkbox"/> スターラー | <input type="checkbox"/> キムワイプ |
| <input type="checkbox"/> ホルダー | <input type="checkbox"/> クランプ | <input type="checkbox"/> 200 ml メスシリンダー |
| <input type="checkbox"/> 染色バット ^{*2)} | <input type="checkbox"/> パスツールピペット | <input type="checkbox"/> ウォーターバスインキュベーター |
| <input type="checkbox"/> 500 ml ビーカー | <input type="checkbox"/> アスピレーター | |

*2) 染色バットの外側に、水 200 ml を入れた時の水面の位置に印を付けておくと便利である。印を付けた場合には、実際にスライドグラスをセットしたホルダーを染色バットに入れた時、スライドグラスの組織切片の部分がバッファーに確実に浸ることを確認しておく。スライドグラスの枚数が少ない場合、50 ml ディスポーザブル遠心チューブ (スライドグラスを背合わせすることにより、2 枚まで扱える) やスライドグラス 5 枚用染色壺でも代用できる。これらを使用する場合にはホルダーは必要ない。

- ① 染色バット 18 個、500 ml ビーカー 1 個、スターラーバー、クランプを用意する。下記の (1)~(15)、(17)~(19) の溶液^{*3)} は染色バットに 200 ml (目盛りまで) 入れておく。(19) は 42°C (³⁵S 標識の場合は 50°C) に保温しておく。(16) の ISHR3 (Acetylation Buffer) は 500 ml ビーカーに 400 ml (目盛り) まで注ぎ、ビーカーにスターラーバーを入れておく。各溶液を番号順に並べておく。

*3) (7)~(10) エタノールを d.d.H₂O (RNase free) で指定の濃度に希釈する。

(12) ISHR1 (PBS Buffer) のみあらかじめ染色バットに入れておき、ISHR6 (Proteinase K Solution) は使用直前に加える。

(19) 50%ホルムアミド / 2 × SSC 調製方法：ホルムアミド 450 ml と ISHR 5 (4 × SSC) 450 ml を混合する。200 ml を前処理に使用し、残りの 700 ml は、ハイブリダイゼーション後の洗浄などで使用する。

- ② ハイブリダイゼーションの際に組織上にのせるプローブがすぐわかるように、スライドガラスのフロスト部に、フロストマーカで、組織切片と RNA プローブの名前を書き込む。切片を 4°C で保存していた場合には、脱パラフィンを行う前に室温に戻しておく。

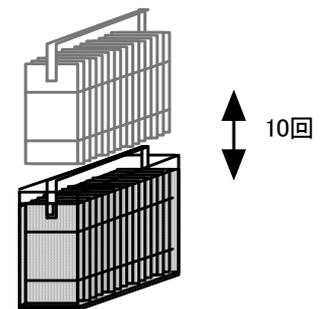
- ③ ②のスライドガラスをプローブの種類ごとにホルダーにセットする。

- ④ 脱パラフィンを行う。

(1) にスライドガラスをホルダーごと浸し、ピンセットでホルダーを 10 回程度上下に動かした後、溶液中で指定の時間静置する(図 1)。その後、ピンセットでホルダーを溶液から取り出し、染色バットの内壁でホルダー内に溜まっている溶液を切って次の染色バットに移す。(1)~(11) まで同様に処理する。

(1) キシレン	室温	5 分間
(2) キシレン	室温	5 分間
(3) キシレン	室温	5 分間
(4) エタノール	室温	5 分間
(5) エタノール	室温	5 分間
(6) エタノール	室温	5 分間
(7) 90%エタノール ^{*3)}	室温	5 分間
(8) 80%エタノール ^{*3)}	室温	5 分間
(9) 70%エタノール ^{*3)}	室温	5 分間
(10) 50%エタノール ^{*3)}	室温	5 分間
(11) ISHR 1 PBS Buffer	室温	10 分間

図 1



- ⑤ タンパク質分解酵素処理を行う。(結合組織などを分解し、プローブの浸透性をよくする。プローブの非特異的吸着を抑える)

以下の溶液で④と同様に処理する。(12) の処理時間および Proteinase K の濃度と時間は、組織切片の種類によって異なるため、あらかじめ条件検討をしておく。添付のコントロール組織切片を使用する場合は Proteinase K を終濃度 5 μg/ml になるように加え、室温で 10 分間処理する。

(12) ISHR6 (終濃度 5 μg/ml Proteinase K) / ISHR1 PBS Buffer	室温	10 分間 (コントロール組織切片の場合)
(13) ISHR2 PBS (Glycine) Buffer	室温	10 分間
(14) ISHR1 PBS Buffer	室温	3 分間
(15) ISHR1 PBS Buffer	室温	3 分間

- ⑥ アセチル化する。(組織への標識プローブの非特異的な吸着によるバックグラウンドを防止する)
 (16)のビーカーをスターラーにのせ、スライドグラスをホルダーごと浸す。スターラーでよく攪拌しながら、ISHR4 (Acetic anhydride) をパスツールピペットなどを用いて5分間かけて1 ml 滴下し (100 μ l / 30 秒)^{*4)}、さらに15分間攪拌する(図2)。

*4) ISHR4 (Acetic anhydride) を加えると加水分解が起こるので、少量ずつ加えていく。

(16) ISHR3 Acetylation Buffer + ISHR 4 Acetic anhydride
 室温 15 分間

- ⑦ 洗浄する。(Acetylation Buffer を洗い流す)

④と同様に(17)、(18)で処理する。

(17) ISHR5 4 \times SSC 室温 10 分間
 (18) ISHR5 4 \times SSC 室温 10 分間

- ⑧ プレハイブリダイゼーションを行う。(プローブの浸透を良くし、プローブの特異的な吸着を抑える)

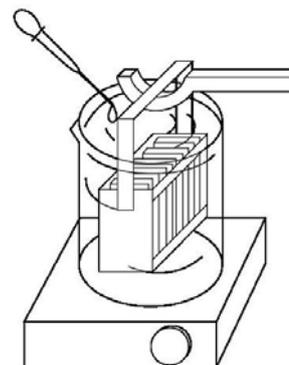
④と同様に(19)で処理する。

(19) 50%ホルムアミド / 2 \times SSC 42°C^{*5)} 30 分間

*5) ³⁵S 標識の場合は50°C。

図2

スライドグラスをホルダーごと図のようにクランプに吊り下げて溶液に浸し、ラックの周りに ISHR4 Acetic anhydride を滴下する。



2. ハイブリダイゼーション

<ハイブリダイゼーション時の組織切片とRNAプローブの組み合わせ>

ハイブリダイゼーションは、以下の組み合わせで行う。

組織切片	プローブ			
	NGF - AS	NGF - S	AS	S
マウス(雄)アダルト顎下腺 (添付)	a	b	-	-
ポジティブコントロール用	-	-	c	d
ネガティブコントロール用	-	-	e	f
未知	-	-	g	h

<試薬>

ISHR7 Hybridization Buffer^{*6)} プローブの種類と同じ本数

*6) ISHR Starting Kit ではチューブ 1 本あたり 93 μ l、*In situ* Hybridization Reagents では 465 μ l 入っている。

RI 標識プローブの場合、さらに以下の試薬が必要である。

ISHR8 1.2 M DTT Solution^{*7)} 34 μ l

*7) *In situ* Hybridization Reagents では、ISHR8として DTT (Powder) 93 mg 及び溶解用滅菌水 500 μ l が含まれている。使用前に DTT (Powder) 93 mg 入りのチューブに添付の溶解用滅菌水 500 μ l を加えて溶解する。溶解後は-20°Cで保存する。

<器具>

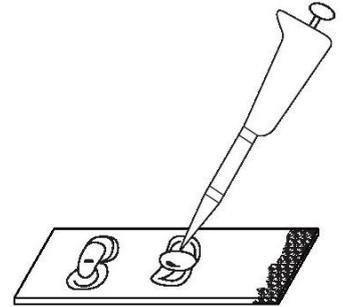
- 使い捨て手袋
- 棒^{*8)}
- 角型シャーレ
- 密閉できる箱 (ミニデシケーターなど) またはビニールテープ
- マイクロピペット及びチップ (1 ml 及び 200 μ l 用)
- アスピレーター
- パスツールピペット

*8) 角型シャーレ中でスライドグラスをのせておくために使用する。割り箸でも代用できる。

- ① ISHR7 (Hybridization Buffer) を「Ⅲ RNA プローブの調製」で調製したプローブの種類と同じ本数用意する。^{*9)} 42°Cに保温しておく。

*9) RNA プローブが³⁵Sで標識の場合には、ISHR8 (1.2 M DTT Solution) を加え、タッチミキサーで混合する。加える量は ISHR Starting Kit の場合 8.5 μ l、ISHR の場合 42.5 μ l である。

図 3

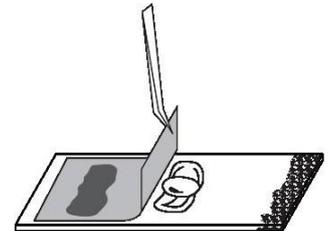


- ② ①のチューブに混合する RNA プローブの名前を記入し、Ⅲで調製した RNA プローブをそれぞれ加える。終濃度 0.1~1 μ g/ml^{*10)} になるようにする。粘性が高いため、タッチミキサーで十分攪拌する。

*10) ³⁵S 標識の場合は、終濃度 5 × 10,000 dpm/ μ l。

- ③ ピンセットで「V1. 前処理⑧ (19)」で処理したスライドグラスを取り出し、スライドグラスに付着しているバッファーの水滴を滅菌済パスツールピペットを付けたアスピレーターを用いて除去する。

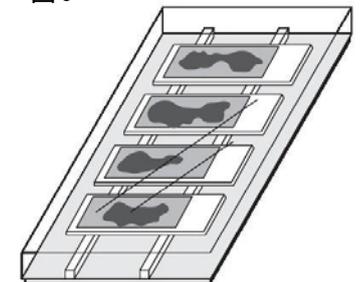
図 4



- ④ スライドグラス上の組織切片に、②で調製したハイブリダイゼーションバッファーを、切片一つ一つを覆うようにマイクロピペット (滅菌チップ) で滴下する。(図 3)

- ⑤ 空気が入らないようにピンセットを用いて、切片にパラフィルム (2.5 × 3.0 cm) を注意深くかぶせる。(図 4)

図 5



- ⑥ 角形シャーレにキムワイプを敷き、「V1. 前処理①」で調製した 50%ホルムアミド/2 × SSC」を 4~5 ml をしみこませる。その上に棒を 2 本セットする。

- ⑦ ⑥の棒上に⑤のスライドグラスを 4 枚のせ、蓋をする。(図 5)

- ⑧ 乾燥を防ぐため、密閉できる箱 (ミニデシケーターなど) に入れるか、または角シャーレの周囲をビニールテープで巻いて密封する。

- ⑨ 42°C (³⁵S 標識の場合は 50°C) で 16 時間インキュベートする。バックグラウンドが高くなったりする場合には、サンプルによって温度を若干変えると効果が得られることがある。

3. 洗淨

*「V-1.前処理」、「V-2.ハイブリダイゼーション」で使用した器具（ピンセット、ホルダー、染色バットなど）は、RNase のコンタミを避けるため以後の操作では使用しないようにする。

<試薬>

<input type="checkbox"/> ISHR 9	NTE Buffer	400 ml
<input type="checkbox"/> ISHR 10	RNase A Solution	0.4 ml
<input type="checkbox"/> ISHR 11	0.1 × SSC	600 ml

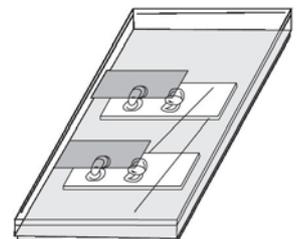
<器具>

<input type="checkbox"/> 使い捨て手袋	<input type="checkbox"/> 染色バット	<input type="checkbox"/> 200 ml メスシリンダー
<input type="checkbox"/> ピンセット	<input type="checkbox"/> 500 ml ビーカー	<input type="checkbox"/> ウォーターバスインキュベーター
<input type="checkbox"/> ホルダー	<input type="checkbox"/> キムワイブ	

- ① 以下の (1) ~ (8) は洗淨の処理方法である。
染色バットを 8 個用意し、(1)~(8) を染色バットに 200 ml (目盛りまで) 注ぎ、番号順に並べておく。^{*11)}
保温の必要なものについては、あらかじめ 42°C (³⁵S 標識の場合は 50°C) で保温しておく。
^{*11)} (1)~(3)は、「V1. 前処理 ①」で調製した 50%ホルムアミド / 2×SSC」を使用する。
(5) は、ISHR9 (NTE buffer) を正確に 200 ml 入れ、保温しておく。ISHR10 (RNase A Solution)は
使用直前に 0.4 ml (終濃度 20 μg/ml になるように) 加える。

- ② 新しい角シャーレに「V1. 前処理①」で調製した 50%ホルムアミド / 2×SSC」の残り (約 100 ml) を入れ、ピンセットでスライドグラスを浸す。
スライドグラスにかぶせてあったパラフィルムが、完全にはがれて
浮かんできたら (図 6)^{*12)}、スライドグラスをピンセットでホルダーに移す。
^{*12)} 無理にはがさないこと。

図 6



- ③ 洗淨する。(ハイブリダイズしなかったプローブを除去する)
(1) にスライドグラスをホルダーごと浸し、保温したまま毎分 90 回転位の
スピードで 20 分振とうする。(2)、(3) でも同様に処理する。
- | | | | |
|-----|-------------------|---------------------|------|
| (1) | 50%ホルムアミド / 2×SSC | 42°C ^{*5)} | 20 分 |
| (2) | 50%ホルムアミド / 2×SSC | 42°C ^{*5)} | 20 分 |
| (3) | 50%ホルムアミド / 2×SSC | 42°C ^{*5)} | 20 分 |
- ④ RNase A 処理する。(非特異的な結合によるバックグラウンドを低くする)
(4) にスライドグラスをホルダーごと浸し、5 分放置する (ホルムアミドを洗い落とす)。
ホルダーを (5) に移し、正確に 30 分放置した後、(4) に戻し、同様に 3 分間処理する。
- | | | | |
|-----|--|------|------|
| (4) | ISHR9 NTE Buffer | 37°C | 5 分 |
| (5) | ISHR10 (終濃度 20 μg/ml RNase A) / ISHR9 NTE Buffer | 37°C | 30 分 |
| (4) | ISHR9 NTE Buffer | 37°C | 3 分 |
- ⑤ 洗淨する。(RNase A による分解産物を取り除く)
(6) ~ (8) の溶液で、③と同様に処理する。
- | | | | |
|-----|------------------|---------------------|------|
| (6) | ISHR11 0.1 × SSC | 42°C ^{*5)} | 20 分 |
| (7) | ISHR11 0.1 × SSC | 42°C ^{*5)} | 20 分 |
| (8) | ISHR11 0.1 × SSC | 42°C ^{*5)} | 20 分 |

VI 検出

ここで使用する試薬は、ISHR Starting Kit 及び *In situ* Hybridization Reagents に含まれていない。

1. RNA プローブを DIG 標識した場合の検出

1-1 抗体反応と発色反応

<試薬>

- | | | |
|--|--|---------|
| <input type="checkbox"/> Buffer 1 | 800 ml | 室温保存 |
| 組成 : 100 mM Tris-HCl (pH 7.5 at 20°C), 150 mM NaCl | | |
| <input type="checkbox"/> Buffer 2 | 150 - 400 μ l \times スライドガラスの枚数 ^{*1)} | -20°C保存 |
| 組成 : 1% (w/v) blocking reagent | | |
| Buffer 1 で 50~70°Cにて穏やかに攪拌して溶解したもの | | |
| <input type="checkbox"/> 抗 DIG-AP 標識抗体 | 150 - 400 μ l \times スライドガラスの枚数 ^{*1)} | 4°C保存 |
| 抗 DIG-AP 標識抗体を Buffer 2 にて 500 倍希釈したもの | | |
| <input type="checkbox"/> Buffer 3 | 200 ml | 室温保存 |
| 組成 : 100 mM Tris-HCl (pH 9.5 at 20°C), 100 mM NaCl, 50 mM MgCl ₂ | | |
| <input type="checkbox"/> NBT / BCIP 溶液 | 150 - 400 μ l \times スライドガラスの枚数 ^{*1)} | 用時調製 |
| 例) 使用直前に NBT (100 mg/ml) 5 μ l と BCIP (50 mg/ml) 5 μ l に Buffer 3 1 ml を加えて混合液を調製する。 | | |
| <input type="checkbox"/> Buffer 4 | 200 ml | 室温保存 |
| 組成 : 10 mM Tris-HCl (pH 8.0 at 20°C), 1 mM EDTA | | |
| <input type="checkbox"/> 90%グリセロール | | |

*1) 切片のサイズや数によって必要な試薬量が変わる。切片を十分に覆う量で行う。

(注) Blocking Reagent、抗 DIG-AP 標識抗体(AP 標識抗ジゴキシゲニン抗体, Fab フラグメント)、NBT および BCIP は、ロシュ・ダイアグノスティクス社より購入できます。これらの試薬がキットになっている「DIG 核酸標識キット」を用いることもできます。詳細については「DIG 核酸標識キット」マニュアルを参照してください。

<器具>

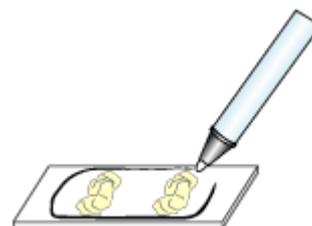
- | | |
|-----------------------------------|--------------------------------|
| <input type="checkbox"/> 染色バット | <input type="checkbox"/> マニキュア |
| <input type="checkbox"/> マイクロピペット | <input type="checkbox"/> パップペン |
| <input type="checkbox"/> カバーガラス | <input type="checkbox"/> 暗箱 |

① 下記の (1)、(3)、(5)、(6)、(7)、(9) の溶液を染色バット 6 個に 200 ml (目盛りまで) 注ぎ、番号順に並べておく。

② 「V3. 洗浄 ⑤ (8)」まで処理したスライドガラスの切片の周りをパップペンで囲み (図 1)、70%エタノールをきりふきでふきつける。^{*2)}

*2) エタノールをふきつけることにより、パップペンが消えにくくなる。

図 1



1-2 組織染色

ノマルスキー微分干渉装置や位相差顕微鏡が無い場合は、組織染色をすることにより、組織のきれいな像が得られる

<試薬>

- メチルグリーンまたはサフランin O^{*4)}
- クロロホルム (メチルグリーンを使用する場合)

*4) 組織染色にはメチルグリーンまたはサフランin Oを用いる。

メチルグリーン溶液調製方法：

1. メチルグリーンを0.2%になるようにd.d.H₂O (RNase free) に溶かす。
2. 分液ロートに入れ、クロロホルムと混和させた後静置し、クロロホルム層のみを落とす。
クロロホルムにメチルグリーン液中のメチルバイオレットが溶出するので、メチルバイオレットの色が出なくなるまで2～3回繰り返す。
3. 2～10℃で遮光保存する。

サフランin O 溶液調製方法：

1. サフランin O を0.2～0.25%になるようにd.d.H₂O (RNase free) に溶かす。
2. 2～10℃で遮光保存する。
3. 使用時に濾過する。

<器具>

- 染色バット
- 分液ロート (メチルグリーン調製用)

- ① 染色液 (メチルグリーンまたはサフランin O 溶液) を染色バットに200 ml (目盛りの所まで) 入れ、スライドガラスをホルダーごと、メチルグリーンの場合は10秒～1分、サフランin O の場合は1～10秒浸す。
- ② 洗浄する。
染色バットに水道水をオーバーフローさせ、そこにスライドガラスをホルダーごと入れ、5分間流水水洗する。
- ③ ホルダーを染色バットから取り出し、水滴を除去し、90%グリセロールで封入する。
カバーガラスが動かないようにマニキュアなどで縁を固定する。
- ④ 検鏡する。「VII 検出例」参照。

2. RNA プローブを ^{35}S 標識した場合の検出

2-1 脱水

<試薬>

- エタノール 920 ml
- キシレン 200 ml

<器具>

- 染色バット 6 個

- ① 下記の (1) ~ (6) の溶液を染色バット 6 個に 200 ml (目盛りまで) 注ぎ、番号順に並べておく。
- ② 脱水する。
スライドガラスをホルダーにセットし、ホルダーごと (1) の溶液に浸す。ピンセットでホルダーを持ち上げ、10 回上下に動かした後、3 分間静置する (V1. 前処理④ 参照)。(1) と同様に (2) ~ (6) で処理する。
 - (1) 70%エタノール 室温 3 分
 - (2) 90%エタノール 室温 3 分
 - (3) エタノール 室温 3 分
 - (4) キシレン 室温 3 分
 - (5) エタノール 室温 3 分
 - (6) エタノール 室温 3 分
- ③ 自然乾燥する。

2-2 オートラジオグラフィー

<試薬>

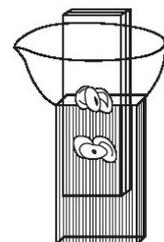
- NTB2
- シリカゲル

<器具>

- 暗箱 [暗箱を用意できない場合:スライドガラスケース, 黒のビニール袋 2 枚, 黒のテープ]
- ウォーターバス
- 乳剤入れ

- ① 乳剤入れに、NTB2 (乳剤) を等量の蒸留水に溶かしたものを準備し、ウォーターバス中で 42°C に温めておく。
- ② 42°C の乳剤の中へ、スライドガラスを 2 枚背合わせにして数秒浸す。
(図 1)
- ③ 室温で 20 分、風乾させる。
- ④ 暗箱にスライドガラスを入れ、シリカゲルを入れて黒のテープで密封する。これを黒のビニール袋の中に入れ、袋の口から光が入らないようにテープで止める。これをさらにもう一枚の黒のビニール袋の中に入れ、密封する。
- ⑤ 4°C で 7 ~ 14 日露光する。

図 1



2-3 現像、定着

<試薬>

- Kodak D-19
- Fuji fix

<器具>

- 染色バット 3個

- ① スライドグラスをホルダーにセットする。
- ② 染色バットに Fuji fix、Kodak D-19 (現像液)、水道水を入れて並べておく。
- ③ Kodak D-19 を用いて、スライドグラスを 20°C で 3 分現像する。
- ④ 水道水で 1 分洗浄する。
- ⑤ Fuji fix で 5 分固定する。
- ⑥ 30 分流水水洗する。

2-4 染色、検鏡

<試薬>

- ヘマトキシリン (Derafield)^{*5)} 200ml
- エオジン 2g
- エタノール 1,210 ml
- キシレン 600ml
- Entellan New

*5) 溶液状のものを使用すると便利である。粉末状のものを使用する際には、以下の通り調製して使用する。
なお、製品によっては、乳剤の銀粒子を溶かしてしまうものもあるので注意する。

ヘマトキシリン調製方法：

- ① 粉末状ヘマトキシリン 4 g を 100%エタノール 25 ml に溶かし、よく攪拌する。
- ② アンモニウムミョウバン 40 g を蒸留水 400 ml に溶かし、よく攪拌する。
- ③ ①と②を透明なガラス瓶に入れ、混合した後、ガーゼまたはキムワイプで口をふさいで、日のよく当たる窓辺に 3~4 日置いておく。
- ④ 上部に個体が浮いてくるので、これをガーゼで濾過した後、保存用の瓶に入れる。

<器具>

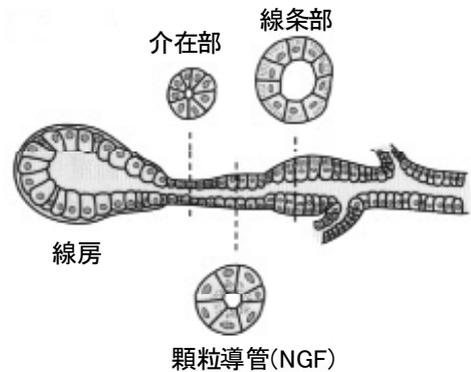
- 染色バット 13 個

- ① 染色バット 13 個に、以下の(1)、(3)~(13)の溶液を 200 ml(目盛りまで)分注し、番号順に並べておく。
- ② ヘマトキシリン染色をする。(1) にスライドグラスをホルダーごと浸し、室温で 3 分処理する。
(1) ヘマトキシリン (Derafield) 室温 3 分
- ③ 洗浄する。染色バットに水道水をオーバーフローさせ、そこにスライドグラスをホルダーごと入れ、60 分流水水洗する。
(2) 流水水洗 室温 60 分 (オーバーフロー)
- ④ スライドグラス裏面の余分な乳剤をプラスチック製の定規などでこすり取る。

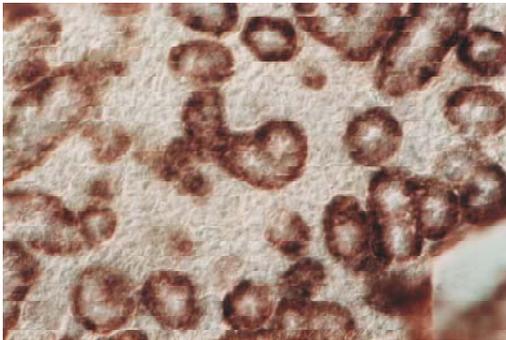
VII 検出例

マウス（雄）アダルト顎下腺組織切片をマウス神経成長因子（NGF）アンチセンスおよびセンスRNAプローブを用いて *in situ* ハイブリダイゼーション法でシグナルを検出した。

マウス顎下腺の中には右図のような構造が多重に存在している。
NGF mRNA は、男性ホルモンに依存してマウス(雄)アダルト顎下腺の顆粒導管において特異的に発現している。



<DIG 標識>



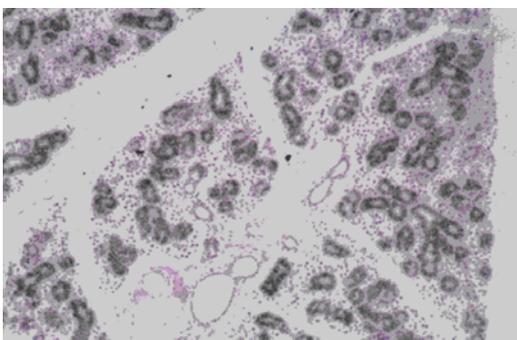
ポジティブコントロール
【NGF-AS プローブ】



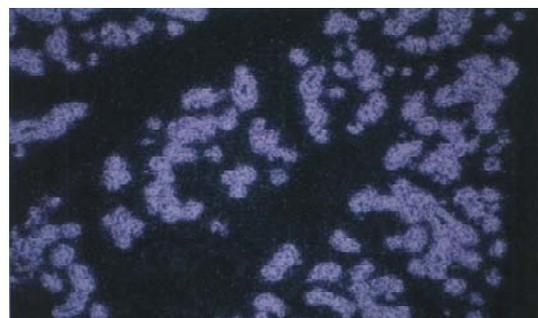
ネガティブコントロール
【NGF-S プローブ】

最も濃くなっている部分が抗 DIG-アルカリホスファターゼ標識抗体反応にて得られたシグナルである。

<RI[³⁵S]標識>



明視野
【NGF-AS プローブ】



暗視野
【NGF-AS プローブ】

明視野において銀粒子は黒い点として見える。暗視野では銀粒子は白く光って見え、シグナルのみを鮮明に確認できる。

VIII トラブルシューティング

トラブル	原因	対策
RNA が合成されない	鋳型 DNA の純度が低い	<ul style="list-style-type: none"> 鋳型 DNA をフェノール/クロロホルム抽出あるいはエタノール沈殿により再精製する。必要であれば Proteinase K 処理を行う。
	ポリメラーゼに問題がある	<ul style="list-style-type: none"> ポリメラーゼが失活している場合、新しいポリメラーゼを用意する。 ポリメラーゼの種類を間違えていないかを確認する。
	操作中 RNase がコンタミした	<ul style="list-style-type: none"> 使用する器具、試薬は RNase free のものを使用する。(滅菌を行う場合: 乾熱滅菌 200°C 4 hr.以上, オートクレーブ 121°C 40 min. 以上) 実験中、使い捨て手袋を着用する。
合成された RNA の量が少ない	鋳型 DNA の純度が低い	<ul style="list-style-type: none"> 鋳型 DNA をフェノール/クロロホルム抽出あるいはエタノール沈殿により再精製する。必要であれば Proteinase K 処理を行う。
	ポリメラーゼが失活している	<ul style="list-style-type: none"> 新しいポリメラーゼを用意する。
	DIG 標識した RNA をフェノール/クロロホルム抽出した	<ul style="list-style-type: none"> DIG 標識した RNA をフェノール/クロロホルム抽出すると、DIG 標識した RNA の部分的なフェノール相へのロス(約 20%)が起こるため、通常はフェノール/クロロホルム抽出を行わない。フェノール相へのロスは塩を加えることにより増加する。
誤った RNA が合成された	鋳型 DNA が完全に直鎖状になっていない	<ul style="list-style-type: none"> 鋳型 DNA が完全に直鎖状になるように制限酵素による消化を行う。アガロースゲル電気泳動により、鋳型 DNA が直鎖状になっていることを確認する。
	鋳型 DNA を直鎖状にする際、3' 突出末端または平滑末端を形成する制限酵素を用いた	<ul style="list-style-type: none"> 3' 突出末端または平滑末端を持つ鋳型 DNA からは、プロモーターに司令された転写物が作られることがあるため、5' 突出末端を形成する制限酵素により消化を行う。
20%パラホルムアルデヒド溶液を調製する際、パラホルムアルデヒドが溶けない	古いパラホルムアルデヒドを使用した	<ul style="list-style-type: none"> 新しいパラホルムアルデヒドを使用する。
	刺激臭が弱い	
	古い NaOH 溶液を使用した	<ul style="list-style-type: none"> 空気中の炭酸ガスにより中和されているおそれがある。新しい NaOH を使用する。
	NaOH 溶液をガラス容器で調製または保存していた	<ul style="list-style-type: none"> ガラス製の容器を使用した場合、ケイ素が NaOH に溶け出しているおそれがある。
組織切片がスライドガラスからはがれる	溶解させる時の温度が低い	<ul style="list-style-type: none"> 50~60°C で溶解する。
	組織の脱水が不十分である	<ul style="list-style-type: none"> 組織を十分に脱水する。大きい組織で液の浸透性の悪いものは脱水時間を長くするなど、組織により時間を調節する。

トラブル		原因	対策
組織切片がスライドガラスからはがれる		切片とスライドガラスの間に水分が残っている	<ul style="list-style-type: none"> 切片とスライドガラスの間に水分があるとその部分だけ切片が貼り付かない。パラフィン包埋組織切片の場合、十分に伸展した時点で余分な水分を除去し、その後、十分に乾燥させる。凍結組織切片の場合は、ドライヤーの冷風モードで十分に乾かす。
		スライドガラスのコーティングに問題がある	<ul style="list-style-type: none"> スライドガラスを十分に洗浄した後、適切にコーティングする。 市販のコーティング済みスライドガラスを使用する。
		切片に問題がある	<ul style="list-style-type: none"> 質の良い切片を使用する。
		チップの先などで切片に損傷を与えた	<ul style="list-style-type: none"> 切片に損傷を与えないよう注意深く扱う。
添付のポジティブコントロール(マウス雄アダルト顎下腺組織切片/NGF-AS プローブ)の結果がネガティブである		プローブが RNase により分解した	<ul style="list-style-type: none"> 使用する器具、試薬は RNase free のものを使用する。(滅菌を行う場合: 乾熱滅菌 200°C 4 hr., オートクレーブ 121°C 40 min.) 実験中、使い捨て手袋を着用する。
		標識酵素あるいは標識抗体が失活している	<ul style="list-style-type: none"> 新しい標識酵素あるいは標識抗体を使用する。
添付のポジティブコントロール(マウス雄アダルト顎下腺組織切片/NGF-AS プローブ)はポジティブであったが、研究者が用意したポジティブコントロールはネガティブである		プローブに問題がある	<ul style="list-style-type: none"> 鑄型 DNA の純度が低い場合、鑄型 DNA をフェノール/クロロホルム抽出あるいはエタノール沈殿により再精製する。必要であれば Proteinase K 処理を行う。 プローブの濃度を再検討する。
		組織の固定が良くないために、組織内の mRNA の保存度が悪い	<ul style="list-style-type: none"> 組織の固定を適切に行う。
		Proteinase K 処理に問題がある	<ul style="list-style-type: none"> 濃度、時間などの条件を再検討する。
バックグラウンドが高い	プローブの有無に関わらず高い	標識抗体が変性している可能性がある	<ul style="list-style-type: none"> 新しい標識抗体を使用する。
	プローブを入れた場合のみ高い	プローブに問題がある	<ul style="list-style-type: none"> 鑄型 DNA の純度が低い場合、鑄型 DNA をフェノール/クロロホルム抽出あるいはエタノール沈殿により再精製する。必要であれば Proteinase K 処理を行う。 プローブの濃度を再検討する。
	組織全体に(細胞以外の部分も)バックグラウンドが出ている	DIG 標識したプローブが結合しやすい組織である可能性がある	<ul style="list-style-type: none"> プローブの濃度を薄くする。 他の標識 (RI, Fluorescein など) で ISH を行ってみる。他の標識でも同様のバックグラウンドが出る場合は、RNA が非特異的に結合する組織である可能性があるため、DNA プローブを用いてみる。
	細胞のみバックグラウンドが高い	プローブが非特異的に結合している	<ul style="list-style-type: none"> 前処理、洗浄工程に問題があるため、洗浄の条件を厳しくする。
	センスプローブではバックグラウンドが低い	プローブの配列に問題がある	<ul style="list-style-type: none"> プローブの配列を変える。

Ⅸ 参考文献

- 1) 野地澄晴編：別冊実験医学 ザ・プロトコールシリーズ 免疫染色・*in situ* ハイブリダイゼーション (1997)
- 2) Noji, S., Nohno, T., Koyama, E., Muto, K., Ohyama, K., Aoki, Y., Tamura, K., Ohsugi, K., Ide, H., Taniguchi, S. and Saito, T.: *Nature*, 350, 83-86 (1991)
- 3) Pardue, M. L. : *In situ* hybridization in Nucleic acid hybridization, IRL Press (1985)
- 4) 野村慎太郎: 実験医学, 7 (13), 173 (1989)
- 5) 横内裕二, 黒岩 厚: 実験医学 別冊 遺伝子工学ハンドブック, 278 (1991)
- 6) 田中克巳: 顕微鏡の使い方, 裳華房 (1977)
- 7) DIG システムを用いてハイブリダイゼーションを行うためのユーザーガイド., ロシユ・ダイアグノスティクス (1997)
- 8) 説明集[日本語版]DIG 5th., ロシユ・ダイアグノスティクス (1997)

株式会社ニッポンジーン

TEL 076-451-6548

www.nippongene.com

お問い合わせは、お電話もしくは Web フォームより承っております。