

# 切片 *in situ* ハイブリダイゼーション習得キット

## Section *in situ* hybridization starting Kit

### 製品マニュアル

Cat No.AA-4020

～ご使用前に本誌をよくお読みいただき、正しいお取り扱いをお願い致します～

#### 【製品説明】

本製品は、*in situ* hybridization (ISH) を初めて実施する方のため、これまで2～3日かかっていた作業時間を出来るだけ短縮し、1日でもより簡便に切片 ISH を体験できるよう開発したハイブリダイゼーション練習用キットです。ISH 法は、原位置(*in situ*)での核酸 (RNA・DNA) の発現場所を形態的に評価する手法であり、浸透性の良い胚などを用いた方法(ホールマウント *in situ* hybridization) と組織を薄く切った切片を用いた方法(切片 *in situ* hybridization)の2種類があります。

本製品は、切片を用いて mRNA の発現を評価するキットです。

プローブ作製の練習用キットであるプローブ合成トライアルセット(Cat No.AA-4010) の姉妹品です。

#### 【製品内容】

製品内容	内容量
マウス精巢切片	10 枚
プリザベーションプレート(プローブ)	400ng/spot×10 spots/枚×2 枚
Hybridization buffer(ハイブリ溶液)	200 μl×16

保存方法:4℃

使用期限:製品の外箱に別途記載

#### 【取扱い注意】

##### ■ 一般的注意

- ・本試薬はなるべく早く使用し、有効期限を過ぎた試薬は使用しないで下さい。記載された使用方法及び使用目的以外の使用については、染色結果の信頼性を保証できないので、記載内容に従い使用して下さい。
- ・本試薬は直射日光に当てないで下さい。
- ・本試薬は微生物に汚染されないようにして下さい。
- ・本試薬が皮膚および粘膜に直接接触することを避け、万一触れた場合は、水で十分洗い流して下さい。
- ・本試薬の使用後は封をきちんと閉めて下さい。
- ・製品内の容器および付属品等は他の目的に転用しないで下さい。
- ・使用後の容器を廃棄する場合には、廃棄物に関する規定に従い、実験産業廃棄物等区別して廃棄して下さい。

##### ■ 染色上の注意

- ・反応の際には組織が乾燥しないように注意し、必要に応じて湿潤箱を使用して下さい。
- ・実験操作中は RNase(汗や唾液に含まれる)を混入させないように注意し、操作を行って下さい。

## 【原理】

### a) 組織の固定—mRNA を細胞内に保存する—

細胞が死ぬと細胞内の mRNA の分解が急速に進むため、この分解を防ぎ出来るだけ生きている時と近い状態に細胞や組織を保存する必要がある。これを固定と呼ぶが、*in situ* hybridization (ISH) 法においては、この作業が実験の成否に大きく影響する。

mRNA の分解は急速に進むものと考えられているので、一秒でも早く固定しなければならない。(実験動物の場合、灌流固定することを推奨する。ヒトの場合も、数分以内には固定するのが好ましい。)

固定法には、一般的に 2 つの方法(アルデヒド固定とアルコール固定)が開発されてきたが、研究目的に応じて最適の固定法を検討する必要がある。*in situ* hybridization (ISH) 法においては、一般的に 4%パラフォルムアルデヒド(PFA)を固定法として用いる場合が多い。

#### 1. アルデヒド固定 (PFA 固定・ホルマリン固定)

アルデヒド系の固定液を用いてタンパク質を架橋することにより固定する

#### 2. アルコール固定 (FAA 固定など)

アルコールで、タンパク質を変形させることにより固定する

### b) プローブの調製

固定により細胞内に保存した目的の mRNA を検出するため、その mRNA と特異的にハイブリダイズする(目的の mRNA と相補的な配列を持つ)RNA プローブが必要である。

目的の mRNA とハイブリダイズしたプローブの位置を可視化するために、RNA プローブにはあらかじめ標識物質を結合させ、酵素抗体法または蛍光抗体法により可視化を可能にする。

\* 目的の mRNA と相補的な配列の RNA プローブをアンチセンスプローブ(AS)と呼び、ネガティブコントロールとして、目的の遺伝子と同じ配列で組織内の mRNA とはハイブリダイズしない RNA プローブをセンスプローブ(SE)と呼ぶ。

### c) 前処理

固定した組織に対するプローブの非特異的な吸着を防ぐ目的と結合組織などを分解しプローブの浸透性を良くする目的で行う。プローブの浸透性を良くするために、タンパク質分解酵素(ProteinaseK)を用いて処理を行う。タンパク質分解酵素の処理に関しては、組織の種類、固定法と密接に関係し、*in situ* hybridization (ISH)の結果に大きく左右する重要な因子であるため、実験ごとに濃度・反応時間・反応温度などの条件を十分検討しなければいけない。

### d) Hybridization

目的の mRNA と相補的な配列を持つ DIG を標識した RNA プローブをハイブリダイズさせるが、それぞれの遺伝子ごとにハイブリ温度( $T_m$  値)が決定され、その遺伝子の至適温度でハイブリダイズさせる。

$T_m$  は塩基配列の GC 塩基対の含量、配列の長さ、ハイブリ溶液の塩濃度や組成などによって変化する。

経験的な式を下記に記す。

<完全に塩基対が一致している場合>

$$T_m = 81.5 + 16.6(\log M) + 0.41(\%GC \text{ 含量}) - 0.72(\%formamide \text{ 濃度}) - 500/L$$

(M=一価の正イオンのモル濃度、L=プローブの長さ(base))

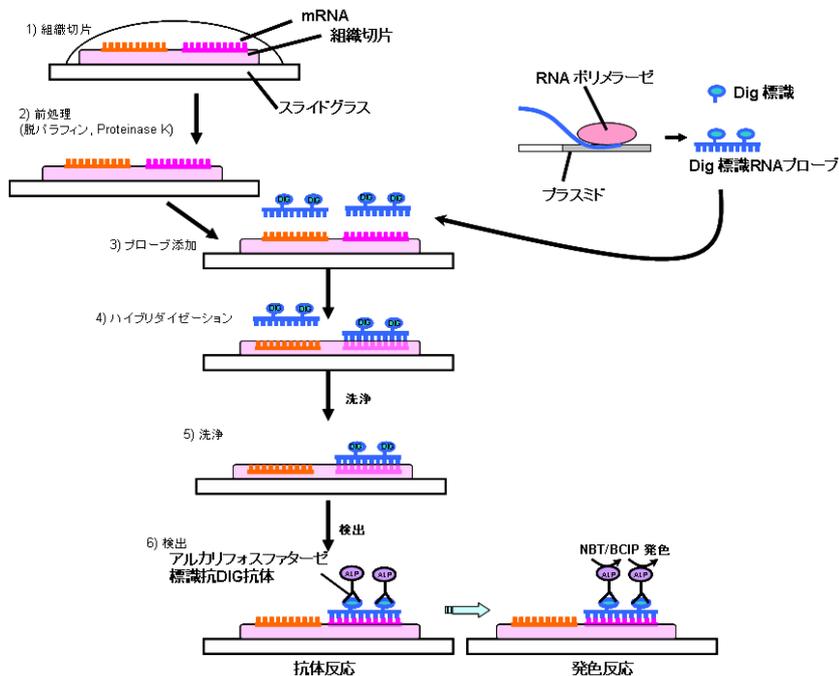
DNA は、A=T または G≡C という相補的な塩基の水素結合により安定な 2 重らせん構造を形成している。DNA の水素結合を切り離し(変性させ)、1本鎖にする方法の一つとして、加熱が用いられる。温度を徐々に高くすると、DNA の 2 重らせんが切り離され、1本鎖になっていくが、温度が低い時の DNA をヘリックス 100%とし、高温で吸光度が一定になる状態をヘリックス 0%とすると、ヘリックス 50%になる温度(融解温度( $T_m$ )と呼ぶ)を決定することができる。

ハイブリ温度は、 $T_m$  より 5°C~20°C低い温度で行う。どの程度塩基対のマッチを許容するかを stringency というが、 $T_m$  より 20°C低い温度でハイブリさせると、stringency は非常に高くなる。

### e) プロープの検出(酵素抗体法または蛍光抗体法)

適当な抗原(標識物質)を結合させた核酸(RNA)を合成し、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。本キットでは、酵素抗体法を使用し検出することを推奨する。DIG 標識 プロープにアルカリホスファターゼ (AP) を標識した DIG に対し特異的な抗体を反応させる。そして、アルカリホスファターゼ(AP)の基質を反応させ発色により検出する。

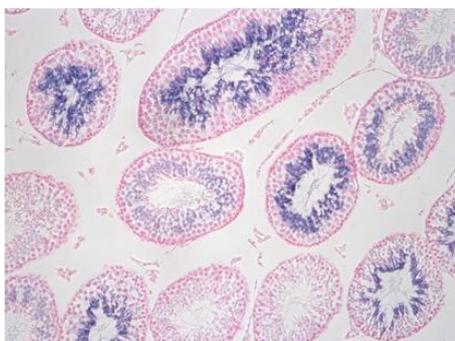
#### 原理



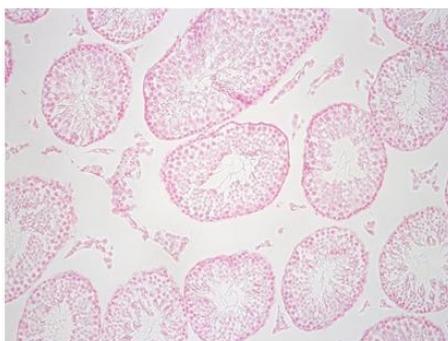
### f) 観察と記録

結果を顕微鏡で観察し、写真として記録する。

#### 染色の例: マウス精巣における protamine1 遺伝子の発現



Mouse protamine1 AS 10x



Mouse protamine1 SE 10x

発色基質: NBT/BCIP

対比染色: Nuclear Fast Red

## 【プロトコール】

### ■必要な試薬・器具・機器

#### (試薬)

必要量については容量が30mLの染色バットを使用した際の目安となります。  
使用する染色バットの容量に応じてご用意ください。

必要試薬	必要量	組成	備考
① PBS*	200 mL	137mM NaCl, 2.7mM KCl, 8mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1.5 mM リン酸二水素カリウム	塩酸あるいは水酸化ナトリウムで pH7.4 にあわせオートクレープで滅菌する。(室温保存)
② キシレン	100 mL	キシレン	
③ 100%エタノール	50 mL	100%エタノール	
④ 70%エタノール	50 mL	70%エタノール/PBS	
⑤ 50%エタノール	50 mL	50%エタノール/PBS	
⑥ 25%エタノール	50 mL	25%エタノール/PBS	
⑦ ProteinaseK*/PBS	50 mL	1 ug/ml ProteinaseK/PBS	20 mg/mL ProteinaseK* (滅菌水に溶解)を事前に調整しストックしておく(遮光 -20°C保存)。反応直前に PBS で希釈し使用する。(用事調整)
⑧ PBS-Glycine*	50 mL	2 mg/ml Glycine/PBS	(室温保存)
⑨ 4×SSC*	150 mL	0.6 M NaCl 0.06 M sodium citrate	水酸化ナトリウムで pH7.0 にあわせオートクレープで滅菌する。(室温保存)
⑩ 0.1×SSC*	50 mL	15 mM NaCl 1.5 mM Sodium citrate	4×SSC*を40倍希釈して用いる。(室温保存)
⑪ TTBS*	300 mL	5 M NaCl 20 mM Tris-HCl (pH8.0) 0.1% Tween20	(室温保存)
⑫ Prehybridization buffer 保湿液	150 ml	2×SSC / 50 % ホルムアミド	4×SSCに等量のホルムアミドを加える。(室温保存)
⑬ ブロッキング溶液*	5 mL	1% (w/v) Blocking powder*/TTBS *Roche 1 096 176	65°C中で振盪しながら完全に溶解する(用事調整)
⑭ 抗体溶液	2 ml	Anti-Digoxigenin-AP* 500倍希釈 *Roche 1 093 274 ブロッキング溶液	用事調整
⑮ 発色バッファー*	60 ml	100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl (pH9.5) 50 mM MgCl <sub>2</sub> , 0.1 % Triton X-100	用時調整
⑯ 発色液	10 mL	450ug/ml NBT* <sup>1</sup> 175ug/ml BCIP* <sup>2</sup> 発色バッファー	70mg/mL NBT/70% ジメチルホルムアミドおよび50mg/ml BCIP/100% ジメチルホルムアミドをそれぞれ事前に調整しストックしておく(遮光 -20°C保存)。発色直前に発色バッファーで450 ug/ml NBT、175 ug/ml BCIPに希釈し使用する。(用事調整)
⑰ TE (pH8.0)	50 mL	10mM Tris-HCl(pH8.0), 1mM EDTA	(室温保存)
⑱ 滅菌水	1000 ml		(室温保存)
⑲ 封入剤	10 ml	70% Glycerol / H <sub>2</sub> O	(室温保存)

\*Wash バッファーセット(AA-4021)として別販売している試薬です。

(器具)

器具	参考器種	使用工程
① 染色バット	アズワン #1440001;乾熱滅菌をかけたものを使用すること	全行程
② ピンセット	乾熱滅菌をかけたものを使用すること	全行程
③ 湿潤箱	耐熱性のものを使用すること	PreHybridization Hybridization , 抗体反応、発色反応
④ パップベン	フナコシ S-PAP-M など	Blocking 前
⑤ パラフィルム		Hybridization
⑥ 50 mL ビーカー		ハイブリ後の洗浄
⑦ 使い捨て手袋		全行程
⑧ キムワイプ・キムタオル		全行程
⑨ カバーガラス	マツナミ 22mm×22mm #C0022221 など	封入
⑩ マニキュア・トップコート		封入
⑪ マイクロピペット		全行程



(機器)

機器	参考機種	使用工程
① ハイブリダイゼーション インキュベーター	タイテック HB-80 など	PreHybridization、Hybridization、洗浄
② ブロックインキュベーター	アステック BI-516H B など	RNA Probe 溶出
③ 光学顕微鏡		観察

## ■ 操作手順

### ① スライドガラスのラベル

スライドガラス(マウス精巣切片)のフロスト部分に、プローブ名(アンチセンスプローブ(AS)・センスプローブ(SE)と区別がつくように)等を記入する。

### ② プローブの溶出

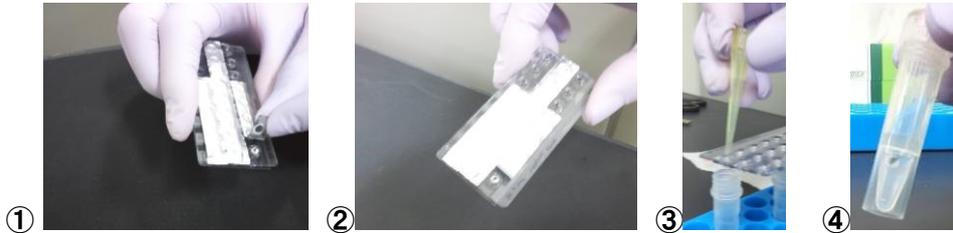
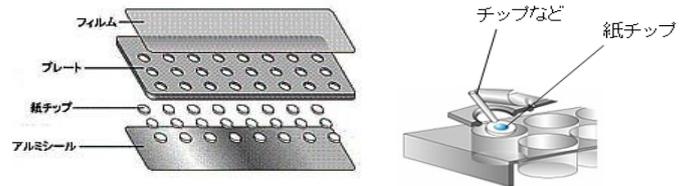
本製品の hybridization 溶液 200  $\mu$ l 中に、プリザベーションプレートのろ紙(紙チップ)を一枚落とし、65 度に温めたブロックインキュベーターにて、プローブの溶出を行う。

\*60 分を目安にハイブリダイゼーションの工程の前にあらかじめ溶出させておく

#### <プローブ溶出方法>

取り出す部分のアルミシールを剥がした後

(カッターなどで、1 箇所分にカットするとよい) フィルムを外し、ピペットチップの先などを使い、紙チップをハイブリバッファーの入ったチューブへ落とし、65 度にてインキュベーションを 1 時間程度行う。



### ② 前処理

表に記載の試薬を上から順に指定の時間・温度で反応させ、液交換を行う。

- 1) 組織が浸る程度に染色バットに試薬を移す。
- 2) スライドガラスを染色バット内の溶液に浸し、指定の時間静置する。
- 3) ピンセットでスライドガラスを溶液から取り出し、次の試薬を入れた染色バットに移す。
- 4) 反応したあとの試薬は、指定の廃棄方法に従って廃棄し、精製水(滅菌済み)でバット内を洗浄し、新しい液に交換する。

処理工程	試薬名	時間	温度
脱包埋剤処理	キシレン	10 分	室温
	キシレン	10 分	室温
	100% エタノール	5 分	室温
	70% エタノール/H <sub>2</sub> O	5 分	室温
	50% エタノール/PBS	5 分	室温
	25% エタノール/PBS	5 分	室温
	PBS	5 分	室温
タンパク質分解酵素処理	proteinaseK/PBS	10 分	室温
	Glycine /PBS	2 分	室温
	PBS	5 分	室温

### ③ プレハイブリダイゼーション

染色バット内に Prehybridization buffer (2×SSC/50%ホルムアミド) を組織が浸るぐらい入れ、65 度で 5 分間静置する  
あらかじめ Prehybridization buffer (2×SSC/50%ホルムアミド)は 65°Cにあたためておくといよ。

#### ④ ハイブリダイゼーション

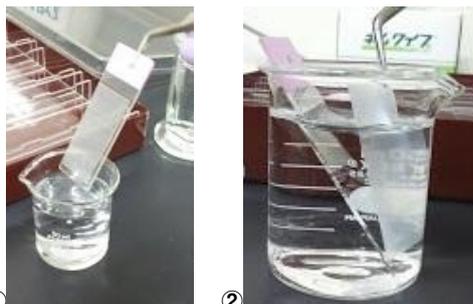
- 1) ピンセットで保湿液(2×SSC/50%ホルムアミド)からスライドガラスを取り出し、組織に触れないように注意し、スライドガラスに付着している水滴をキムワイプなどでよく取り除く。
- 2) スライドガラス上の組織切片に、あらかじめ溶出したプローブ溶液(2μg/ml) 全量を切片を覆うようにマイクロピペットで滴下する。(プローブの種類とラベルした切片の種類が間違っていないか確認して、プローブをのせる。)
- 3) ピンセットを用いて空気が入らないように、切片にパラフィルムを注意深くかぶせる(右写真)。
- 4) 湿潤箱にキムワイプを敷き、保湿液(2×SSC/50%ホルムアミド)を適量しみこませる。
- 5) 湿潤箱に、スライドガラスを置き蓋を閉め、ハイブリダイゼーションインキュベーターの中に入れて65度で60分以上反応させる



#### ⑤ プローブ洗浄

ハイブリ後、スライドガラスを4×SSCの中に移し、液中内で切片の剥離に注意して、静かにパラフィルムを取り除く(下写真)。ピンセットでパラフィルムを除去したスライドガラスを取り出し、右表の通りプローブの洗浄を行う。

処理工程	試薬名	時間	温度
Probe Wash	2XSSC/50%ホルムアミド	5分	65℃
	0.1XSSC	5分	65℃
	TTBS	30分	室温



#### ⑥ ブロッキング・抗体反応・抗体洗浄

- 1) ピンセットでスライドガラスを取り出し、水滴をよく取り除き、スライドの縁に沿ってパップペンで切片の周りを囲み、湿潤箱に載せる。
- 2) パップペンで囲まれた部分に、ブロッキング溶液を約500μl注ぎ、5分室温で反応させる。
- 3) ブロッキング溶液の液を切り、同様に抗体溶液(500倍希釈)を約500μl注ぎ、30分室温で反応させる。
- 4) 抗体の液をよく切り、染色バット内に入れたTTBSで10分間室温にて静置し、抗体の洗浄を行う。  
これを4回繰り返す。

#### ⑦ 発色反応～封入

- 1) ピンセットでスライドガラスを取り出し、キムワイプで水滴をよく取り除く。
- 2) 約500μl発色液を注ぎ、30分間アルミホイルなどで遮光し、室温で反応させる。
- 3) 発色液を切り、染色バット内に入れたTEで5分間室温にて静置し、発色反応を停止させる。
- 4) ピンセットでスライドガラスを移し、PBSで5分間室温にて静置する。
- 5) スライドガラスを染色バットから取り出し、水滴をよく取り除き、70%グリセロールにて封入する。  
カバーガラスが動かないようマニキュアなどでカバーガラスの縁を塗り固定する。  
必要に応じて、対比染色(nuclear Fast Redなど)を行う。

## 簡易プロトコール

工程	使用試薬	時間 (分)	回数		温度	備考	チェック✓
スライドラベル							
プローブ溶出	ハイブリバッファー	60分			65°C		
脱パラフィン	キシレン	10分	2回	染色バット	室温		
	100% エタノール	5分		染色バット	室温		
	70% エタノール	5分		染色バット	室温		
	50% エタノール/PBS	5分		染色バット	室温		
	25% エタノール/PBS	5分		染色バット	室温		
	PBS	5分		染色バット	室温		
前処理	ProteinaseK/PBS	10分		染色バット	室温		
反応停止	Glycine /PBS	2分		染色バット	室温		
洗浄	PBS	5分		染色バット	室温		
プレハイブリ ダイゼーション	Prehybridization buffer *	5分		染色バット	65°C	* 予め 65°C で温めておく。	
ハイブリ ダイゼーション	RNA Probe/ Hybridization buffer	60分		湿潤箱/保湿液	65°C	パラフィルムでカバーする。	
脱パラフィルム	4×SSC			染色バット	室温	4×SSC 中で静かにパラフィルムを剥がす。	
プローブ洗浄	Prehybridization buffer *	5分		染色バット	65°C	* 予め 65°C で温めておく。	
	0.1×SSC *	5分		染色バット	65°C	* 予め 65°C で温めておく。	
	TTBS	30分		染色バット	室温		
ブロッキング	パップペン					組織の周りの余分な液を拭き取った後、 周りを囲うように描く	
	ブロッキング溶液	5分		湿潤箱/H <sub>2</sub> O	室温	組織の上に滴下する	
抗体反応	抗体溶液	30分		湿潤箱/H <sub>2</sub> O	室温	組織の上に滴下する	
抗体洗浄	TTBS	10分	4回	染色バット	室温		
発色	発色液	30分		湿潤箱/H <sub>2</sub> O	室温・ 遮光	組織の上に滴下する	
反応停止	TE	5分		染色バット	室温		
	PBS	5分		染色バット	室温		
封入	70% グリセロール/PBS				室温	カバーガラスの縁をマニキュアで固定する。	



株式会社 アワジェニック

〒 771-0360 徳島県鳴門市瀬戸町明神字板屋島 124-4

Tel 088-683-7178 Fax.088-683-7212

E-mail report\_ourgenic@ourgenic.com