

シリーズ「生理学者のための分子生物学技術講座」

in situ ハイブリダイゼーション (ISH) 法

木 山 博 資
(旭川医科大学解剖学第一)

I. はじめに

解剖学・生理学・薬理学など古くから体系づけられた学問分野はそれぞれ独自の研究手法を持ち、学問分野の発展に寄与してきた。しかし近年の急速な技術発展にともない分野間の境界領域の爆発的な発展や、従来の分野の範囲に入らない研究領域が急速に膨らんできた。従ってある特定の機能の追求には、従来の様々な分野に属する研究技法を駆使して研究を展開して行かなければならない。解剖学者も電気生理をやれば分子生物学もやっけて行かなければならない時代の到来である。自前ですべてをやっけて行くお金と余裕があれば別であるが、異なる分野の研究者どうしが共同研究を流動的に組むことがきわめて重要である。そのためにも、少なくとも他分野の研究手法の概略を把握しておくことが、自らの研究を広く展開して行くために不可欠となってきた。

組織化学の最大の特長は高い空間解像度にあ

る一方、その問題点は定量性にある。しかし、条件設定がうまく行われた実験系で、目的分子の変化の振幅が大きければ、組織中の特定の蛋白や核酸の可視化信号にはある程度の定量性が認められ、最近の画像処理機器などの発達にともない、個々の細胞に於ける蛋白や遺伝子の発現を比較定量する事も可能となってきた。これにより、今まで静的なものにとらえてきた組織学・形態学が動的なものも捉えることができ、様々な生理活性物質の動態を組織上で追跡することが可能になった。従って定量性を兼ね備えた組織学は、多くの生理学的・病理学的現象を高い空間解像度で理解する上で極めて有効な方法として位置づけられつつある。組織化学をよりダイナミックにした手法の一つに、組織中の mRNA を検出する ISH 法がある。一般に組織中の mRNA はその最終産物よりは不安定で、mRNA の発現量は蛋白のそれより大きく変化する。従って mRNA を検出する ISH 法は蛋白発現量の変化をより鋭敏に捉えることができ

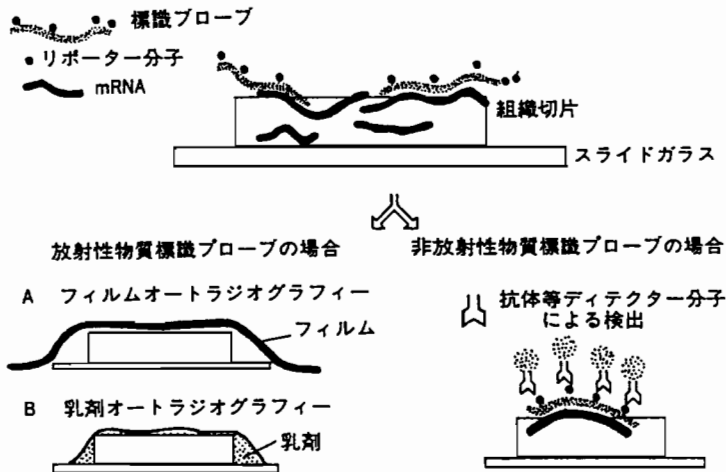


図 1. in situ ハイブリダイゼーション法の概略。

る。本方法では、組織内で特定の mRNA を検出するプローブに mRNA と相補的な塩基配列を持たせ、可視化のためのリポーター分子が標識されている。このリポーター分子が放射性物質であれば可視化はオートラジオグラフィ (ARG) によって行われ、また非放射性物質の場合にはリポーター分子を免疫組織化学的な手法などで可視化しなければならない (図 1)。放射性物質標識されたプローブの可視化にはオートラジオグラフィを用いるが、これが ISH 法の最大の特長である高解像度を低下させることになる。露光時間と解像度の問題は放射性物質標識プローブを用いる際には同時に解決できない問題である。このような問題点を解決する方法として開発が進められたのが、いわゆる非放射性物質標識プローブによる ISH 法である。

II. プローブの選択

研究で ISH を行う必要に迫られたとき、最初の問題はどのタイプのプローブを用いるかである。現在 mRNA 検出にはオリゴプローブ (20~50 mer) か、RNA プローブ (数百から 1 キロベース程度) のどちらかを用いているものがほとんどである。初期に用いられていた M13 系を用いた一本鎖 DNA プローブや 2 本鎖 DNA プローブを用いる方法は最近ではほとんど見られない。オリゴ・RNA のそれぞれのプローブには長短所があり目的・状況に応じて使い分けることが必要である。

オリゴプローブの最大の特長はプローブの合成から ISH の方法が簡単なこと、さらに定量性に優れているということである。シーケンス情報から直ちにオリゴプローブを DNA 合成機にて合成でき、いったん合成すれば数年以上の長時間に渡って保存することができる。また、ターゲットの mRNA とプローブのモル比が 1 : 1 であるため定量性に優れている。さらに特定の短い領域に対するプローブをデザインすることができるため、極めて類似した塩基配列を有する mRNAs を区別できる。例えばスプライシングバリエーションなどを容易に検出でき

る。欠点は、プローブ長が約 20~50 なので 3' 端のテーリング標識により 1 プローブあたりに導入することのできるリポーター分子の数には制限があることである。これが、RNA プローブに比べて検出能が低下する理由である。しかし標的 mRNA の複数の領域に対してそれぞれのオリゴプローブを合成しておき、プローブカクテルとして用いることで、感度は大幅に改善される。一方 RNA プローブの特長はプローブ長が長いこと、導入することのできるリポーター分子の容量が大きいことである。これにより標的 mRNA 1 分子に結合したプローブは多くのリポーターを有することになり、検出能 (いわゆる感度) が向上する。短所としては、特定のベクターに組み込まなければならないことや若干の分子生物学的な手法を必要とし手技が複雑である点があげられる。また、スプライシングバリエーションなどのような類似した塩基配列を有する mRNA を識別することは困難な場合がある (図 2)。

プローブの選択においても一つ重要なことは、リポーターにアイソトープを用いるか非アイソトープを用いるかである。プローブには可視化のためのリポーター分子が標識されているが、リポーターに RI を用いればオートラジオグラフィで、non-RI のディゴキシジェン (DIG) やビオチンなどの小分子を用いれば、最終的には免疫組織化学的に酵素標識し、その発色で可視化することになる。非アイソトープのリポーターとして最もよく用いられるのがディゴキシゲニン (DIG) であり、これらのリポーターは抗体などのディテクター分子によって免疫組織化学的に検出される。したがってリポーターとしては、内因性に存在せず分子量が比較的小さく、かつ良いディテクター (抗体など) が存在するものが良い。また、ディテクターには一般に抗体が用いられるが、最終的には酵素反応的に発色可視化が行われなければならない。このとき、化学増幅度を上昇させるために多段階の反応が多く試みられたが、実際には単純な反応のほうがよいようである。これは反応のス

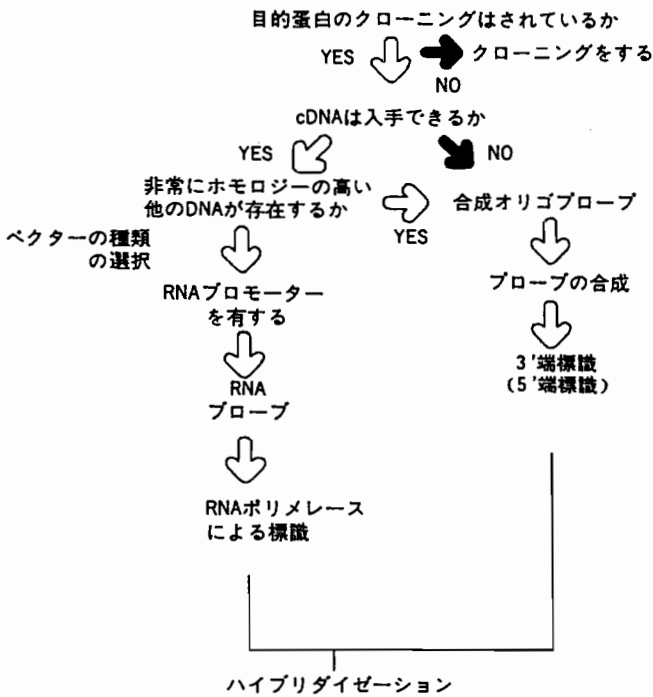


図2. プローブの選択.

ステップが増えるにつれてバックグラウンドも増加し S/N 比が良くなるからであると考えられる。したがって発色のための酵素が直接結合した抗体を用いるのが最もシンプルでよい。発色のための酵素としては HRP やアルカリフォスファターゼがあるが、基質の安定性などを考えるとアルカリフォスファターゼが最もよい。アルカリフォスファターゼの基質 (NBT/BCIP) は最も安定しており HRP の基質の DAB などに比べはるかに長時間の発色反応に耐えうる。

III 組織標本の作成

in situ ハイブリダイゼーション法は組織上に存在する mRNA を検出するので、組織の出来不出来が結果に大きく反映する。滑らかなきれいな切片を作成することが大事である。また、RNase に対してはノーザン法の時ほど過度に敏感になる必要はない。組織中の mRNA は意外に安定である。新鮮凍結標本、パラフィン包埋標本、灌流固定標本 (4%ホルムアルデヒド

による灌流固定が一般的) などいづれも用いることができるが、このうち最も簡単で迅速なものが新鮮凍結標本である。新鮮凍結標本は組織試料を取り出した後、ドライアイスなどで急速に凍結するのが良い。ここで、凍結のスピードが遅すぎると組織が傷むので粉末に潰したドライアイスなどでさっと組織全体を包む様にして凍結する。試料が小さいものであれば液体窒素も良いが、凍結によるヒビ割れなどに注意しなければならない。凍結標本はクライオスタットで 5~20ミクロンの切片を作成する。クライオスタットでの切片作成のこつは、温度管理とアンチロールのバランスにある。新鮮凍結切片の場合には、通常 -10度から -15度ぐらいが適している。最適温度はその日の湿度にも影響される。

切片は可能な限り表面がなめらかでなければならない (メス傷や波打ったものは、アーティファクトの最も大きな原因になる)。標本はシランコート (3-aminopropyltriethoxy-silane, Aldrich) したスライドガラスに貼り付ける。このときスライドガラスの裏から指の腹をあてて切片を暖めながらスライドガラスに貼り付ける。貼り付けた切片は、クライオスタットの庫内でも外でもしばらくの間なら放置してかまわない。但し凍結・融解を繰り返すことだけは避けなければならない。貼り付けた切片は、-20度以下の冷凍庫に保存する。半年から1年ぐらいまで保存しても反応に大きな差は見られない。培養細胞で ISH を行いたいときには、ガラスのチェンバースライドを用いて培養するのが最も便利である。これはスライドガラスの上で細胞培養できるようになっているもので固定後にチェンバー部分はずして通常のスライドガラスのように扱うことができる。

Ⅳ. アイソトープ標識 RNA プローブを用いた ISH

Ⅳ-1. プローブの調整

目的の遺伝子の cDNA を持っている場合はその全長または一部を特定のベクタープラスミドに導入する。ベクタープラスミドには pBluescript (Stratagene) や pGEM (Promega) に代表されるような、2種の RNA polymerase のプロモーター (SP6, T3, T7 など) が逆向きに配置され、その間にマルチプルクローニングサイト (MCS) を有するものがよい (図3)。目的の cDNA 断片を MCS に挿入する。どちらか一方の RNA polymerase を作動させることによりセンスまたはアンチセンスのプローブを合成することができる。また、cDNA が手許にない場合

はシーケンス情報から PCR 用のプライマーを合成し、ライブラリーから500ベース程の cDNA を PCR で取ればよい。この時 PCR によって取れた DNA は必ずシーケンスして確かめておくか、制限酵素で切断してみても予想通りのフラグメントが得られることを確認しておく。

Ⅳ-2. プローブの標識

上記のようにして得られたプラスミドは環状であり、RNA 合成の鋳型とするにはこれを直鎖状にしなければならない (図3)。どちらの RNA polymerase を作動させるかを決め (センスを作るのかアンチセンスを作るのかを決め) 適当な制限酵素で切断し、直鎖化する。RNA プローブ合成のための in vitro transcription キッ

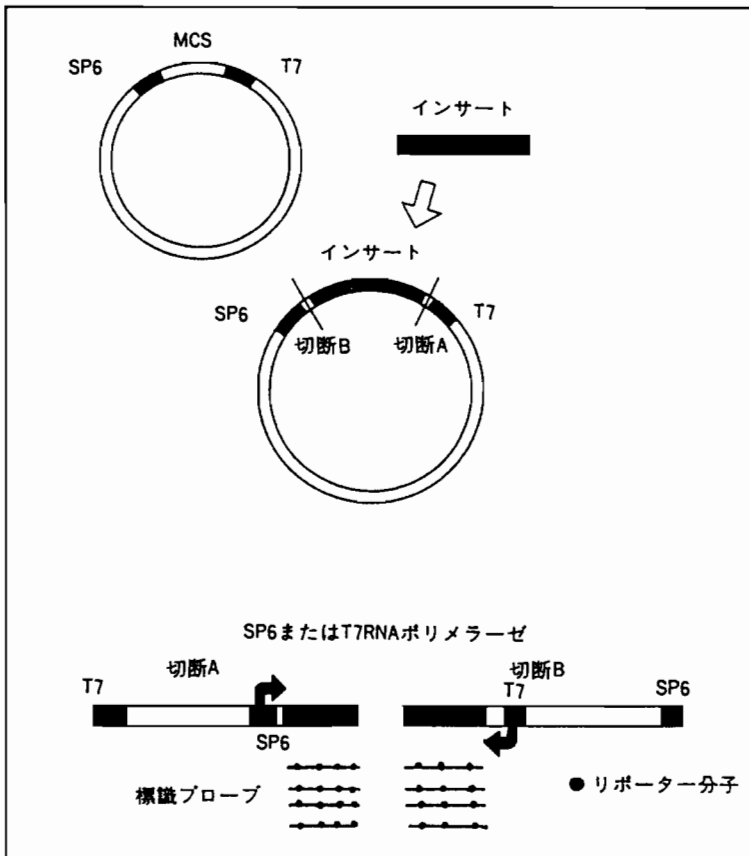


図3. RNA プローブのベクターと標識.

トは各社から販売されており、そのプロトコルに沿って標識すればよい。標識 RI として ^{32}P はエネルギーレベルが高いため短期間のオートラジオグラフィーで結果が得られるが解像度が落ちる。一方 ^3H は高い解像度が得られるがエネルギーレベルが低すぎるため露出時間が数カ月にもおよぶ欠点がある。ちょうど中間のエネルギーレベルを有するという点で、 ^{35}S が好んで用いられる。最近では ^{35}S より少しエネルギーレベルの高い ^{33}P も良く用いられる。

IV-3. ハイブリダイゼーションプロトコル

1. -80°C ~ 20°C で保存してあった切片をドライヤーなどを用いて速やかに室温に戻し乾燥させる。
2. 30分間固定液で固定する(4%パラホルム溶液, 0.1 MPB)。
3. オートクレーブした 0.1 M PBS (pH 7.4) で 2 ~ 3 回洗浄する(各 5 分)。
4. プロテアーゼ K で 5 分間処理。(Proteinase K 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in 50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA)。
5. ステップ 2. で使用した固定液で 15 分処理し、プロテアーゼを失活させる。
6. PBS で 5 分間洗浄する。
7. 組織の前処理, 前処理液(無水酢酸 0.25%, 0.1 M トリエタノールアミン)中で約 10 分切片を処理する。
8. 脱水: 70%, 90%, 100% エタノールにそれぞれ 5 分浸け脱水する。エタノールは滅菌水で希釈する。
9. クロロフォルムまたは、キシレンに 10 分浸ける。
10. 100% エタノールで洗浄する。このエタノールは 5 分以上数時間浸けておいてもよい。実験を数日間延期したい場合にはエタノールに漬けたままで -20°C に保存すれば良く、この場合結果に影響は認められない。
11. 切片を軽く乾燥させ、プローブを含むハイブリバッファー(5 ~ 10×10^6 cpm/ml)をかける。スライドガラス一枚あたり 100 ~ 200 μl のプローブ含有ハイブリダイゼーション液を滴下し、気泡が入らないようにしてカバーガラスかカバーガラスの大きさに切ったパラフィルムをかける。
12. 切片は密閉した湿箱内にいれ 55°C の恒温そうで一晩反応する。
13. 4 XSSC につけ自然にカバーガラスがはずれるのを待つと同時に、軽くハイブリバッファーを取り除く。
14. 約 65°C にあらかじめセットした恒温水槽で 2 xSSC, 50% ホルムアミド, 0.1 M DTT 溶液で切片を約 30 分湯煎洗浄する。
15. RNase バッファー (10 mM TrisHCl, 1 mM EDTA, 0.5 M NaCl) で 37°C 10 分 3 回洗浄する。
16. RNase A (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in RNase バッファー) で 37°C 30 分処理。
17. RNase バッファーで 37°C 10 分洗浄する。
18. 約 65°C にあらかじめセットした恒温水槽で 2 XSSC, 50% ホルムアミド, 0.1 M DTT 溶液で切片を約 30 分湯煎洗浄する。
19. 2 XSSC と 0.1 XSSC でそれぞれ 10 分洗浄する。
20. エタノール系列を通して脱水乾燥させオートラジオグラフィーを行う。オリゴプローブのプロトコル参照。但しカウンター染色の際、ニッスル染色などの染色性がかなり落ちる。(RNase 処理のため)

V. DIG 標識 RNA プローブによる ISH のプロトコル

方法は上述の 19. まで全く同じでよく、その後以下のプロトコルを加える。

1. 発色バッファー A で室温 10 分洗浄。
2. ブロッキング: 発色バッファー A に 1% の Blocking reagent (ペーリンガー) を加えたもので 1 時間室温でインキュベーションする。
3. AP 標識抗 DIG 抗体をステップ 2. で用いたブロッキング用バッファーに加え (1 : 500), 室温で湿箱にいれ、オーバーナイトインキュベーションする。
4. バッファー A にて室温 3 回洗浄(各 30 分)

から1時間).

5. 発色バッファーBで10分洗浄.

6. 発色バッファーBに発色基質 (NBT 225 $\mu\text{g/ml}$, BCIP 263 $\mu\text{g/ml}$) を加え室温遮光で6時間から3日間反応. ときどき顕微鏡で観察して発色の状態を確かめることができる. 発色が不十分であれば, 基質を加えて反応を継続できる.

7. 発色停止バッファー (10 mM MTris-HCl pH 7.0, 1 mM EDTA) で10分以上洗浄.

8. 発色停止バッファーとグリセロールを1:1に混合したもので封入する.

VI. RI 標識オリゴプローブを用いた場合のISHプロトコール

VI-1. プローブのデザイン

最近では各種生理活性物質やその受容体に対するオリゴプローブが販売されており, それらは特異性などについてはあらかじめ調べられているものが多い. また, 検出能力を向上させるために, 一本の mRNA に対して複数の領域に対するオリゴプローブのカクテルが販売されている例も多い. 一般にオリゴプローブは20から50ベースの長さのものを用いるが, 作製するにあたってはいくつかの注意点がある. まずは特異

性であるが, 目的の mRNA と相補的な塩基配列を決定後, その配列が本当に特異的であるかどうかを少なくとも最新のデータベースにアクセスして既知の他の遺伝子とクロスしないことを確認しておく. さらにプローブ同士が互いに一部でアニーリングしたり, 一本のプローブがヘアピン構造をとったりすることを避けなければならない. また, G/C 比があまりにも片寄りすぎているとハイブリダイゼーションの温度が大きく変わることがあるので, 50%前後のニュートラルなプローブの方が良いようである. これらの確認は実際に目で見ても行うことができるが, 最近はオリゴのプライマーやプローブ作製のためのコンピューターソフトが利用でき, これを用いて確認するのが最も容易である. 一旦塩基配列が決定されれば, 合成を業者に発注すれば数日以内に十分量のプローブが送られてくる (1回の反応には1 pmolを使用するので一度合成すればかなりの量が得られる). 現在は1塩基あたり150円から200円程で精製までしてくれる.

VI-2. プローブの標識

オリゴプローブの標識法として最も一般的な

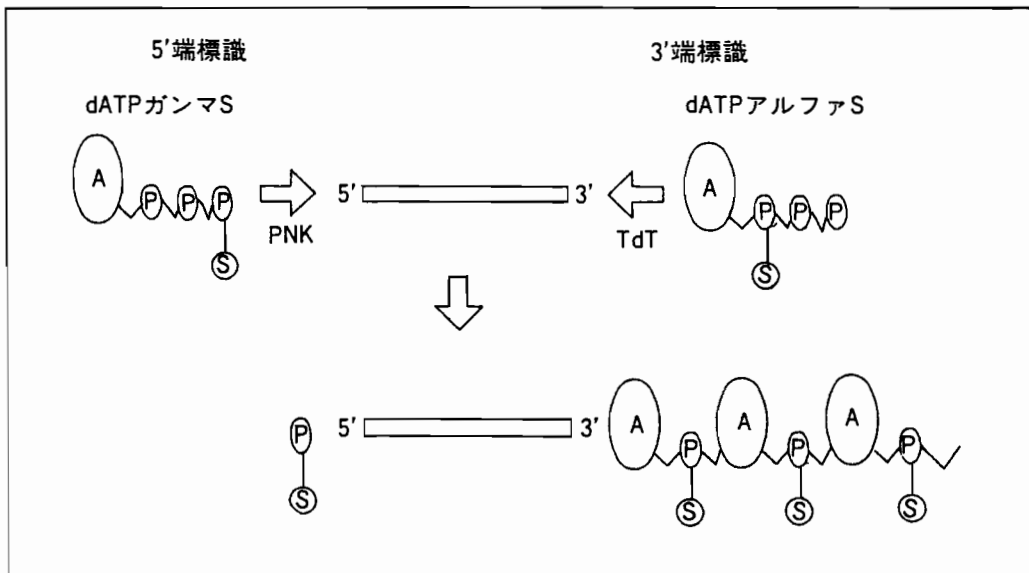


図4. オリゴプローブの標識.

ものは TdT (terminal deoxynucleotide transferase) を用いた 3' 側のテーリングである (図 4)。この標識も各社が販売している 3' 標識のキットを用いればバッファー等も添付されており大変便利である。RI にはやはり ^{35}S 標識の d-ATP または d-CTP を用いる。このとき ^{35}S の標識が三リン酸のアルファの位置に結合しているものを使用する。ガンマーの位置に結合しているものは 5' 側の標識に用いるので注意する。通常 1 pmol のオリゴプローブ溶液 1 μl を反応すれば、一回の反応には十分な標識プローブを得ることが出来る。標識反応後フェノール抽出、エタノール沈澱すれば、導入されなかった未結合の RI は取り除くことが出来る。また、エタノール沈澱のときにイーストの tRNA や salmon testis DNA などのキャリアーを加えて沈澱させる。最終的にはプローブ 1 μg あたり 10 の 9 割程度の CPM が望ましい。

VI-3. ハイブリダイゼーションプロトコール

1. -80°C \sim -20°C に保存してあった切片をドライヤーなどを用いて速やかに室温に戻し乾燥させる。

2. 30分間固定液で固定する (4% パラフォルム溶液, 0.1 MPB)。

3. オートクレープした 0.1 MPBS (pH 7.4) で 2 \sim 3 回洗浄する (各 5 分)。

4. 組織の前処理。前処理液中で約 10 分切片を処理する。

5. 脱水: 70%, 90%, 100% エタノールにそれぞれ 5 分ずつ浸け脱水する。エタノールは滅菌水で希釈する。

6. クロロフォルムまたは、キシレンに 10 分浸ける。

7. 100% エタノールで洗浄する。このエタノールは 5 分以上数時間浸けておいてもよい。

8. 切片を軽く乾燥させ、プローブを含むハイブリバッファー (5-10 $\times 10^6$ cpm/ml) をかける。スライドガラス一枚あたり 100 \sim 200 μl のプローブ含有ハイブリダイゼーション液を滴下し、気泡が入らないようにしてカバーガラスか

カバーガラスの大きさに切ったパラフィルムをかける。

9. 切片は密閉した湿箱内にいれ 37 度の温度の恒温そうで一晩反応する。

10. 1 xSSC につけ自然にカバーガラスがはずれるのを待つ。

11. 約 55 度にあらかじめセットした恒温水槽で 1 xSSC を用いて切片を湯煎洗浄する。15 分から 20 分ごとに SSC 液をあらかじめ暖めた新しいものに代え約 1 \sim 1.5 時間洗浄する。

12. 1 xSSC 中で切片を室温に戻し、素早く蒸留水・70% エタノール (各 1 分以内) に通し乾燥させる。

13. オートラジオグラフィー: 切片がある程度の大きさがある場合 (例えばマウス脳切片) は、まずフィルムオートラジオグラフィーを行うことを薦める。 ^{35}S の場合通常オートラジオグラフィー用のフィルムをあてて 1 週間露出する。これで実験の成否がおおよそ判る。

14. 乳剤オートラジオグラフィー。暗室内で約 40 度に暖めた乳剤 (通常 1:1 に水で希釈する) にスライドガラスをゆっくりと入れ引き上げる。裏面の乳剤をふき取った後、乾燥させる。乾燥させた切片は暗箱に入れ、 ^{35}S で約 3 \sim 6 週間、 ^{33}P で 1 \sim 4 週間露出する。

15. 現像は暗室で現像液 (Kodak D-19, 20 $^{\circ}\text{C}$, 3 \sim 5 min), 停止液 (1% 酢酸, 数十秒), 定着液 (フジフィックスなど 5 分) に順に浸け、最後に水洗い (15 分) の後乾燥させる。定着を長時間すると銀粒子に影響を及ぼすので注意する。

16. 必要ならばニッケル染色や HE 染色などのカウンター染色を行った後カバーガラスで封入する。

VI-4. 非アイソトープ標識オリゴプローブを用いた ISH

RNA プローブを用いた場合には DIG をリポーターとして用いたが、オリゴプローブを用いる場合には DIG は比較的バックグラウンドが高くなる。この理由は不明だが、DIG はステロイド様構造を有しこれがプローブの一方の

側に連続して並ぶとプローブに極性が生じ非特異的に膜に結合しやすくなると考えられる。今のところ非アイソトープ標識オリゴプローブによる ISH で比較的良好な成績を上げているものに、アルカリフォスファターゼ (AP) 標識オリゴプローブによる ISH がある。このプローブはオリゴヌクレオチドに AP 蛋白を結合させたもので、オリゴに蛋白質を結合させるためのアミノ基をあらかじめ導入しておく必要がある。これは、DNA 合成の時にアミノ基を有するヌクレオチドを任意の位置に組み込むことによって可能であり、後はオリゴのアミノ基と AP のアミノ基どうしを DSS などのクロスリンカーにて結合させそれを陰イオン交換カラムで精製する。蛋白と核酸のコンジュゲーションなので、蛋白の取扱に慣れた研究者には良いが、初心者には多少繁雑である。また本プローブの作成を外注することもできる (株ヤトロン)。本プローブを用いた時のプロトコルは前述のプロトコルの 1. から 9. までは同じでよい。異なる点は内因性の AP 活性を失活させるために 3. と 4. の間に 10 分間の 0.2 N HCl での処理を行う。これにより内因性の AP 活性はほとんどなくなるが組織上の mRNA には影響を及ぼさない。またハイブリバッファーには DTT は不要であり、フォルムアミド濃度を 45% にまで下げることができる。前述のプロトコルの 9. より以下に AP 標識プローブの場合を紹介する。

10. カバーガラスを取り除く際にハイブリバッファーを 1 μ l 程度取って置き後で酵素活性をチェックする事ができる。

11. 37度から 50度にあらかじめセットした恒温水槽で 1xSSC を用いて切片を湯煎洗浄する。15分から 20分ごとに SSC 液をあらかじめ暖めた新しいものの換え約 1 から 1.5 時間洗浄する。

12. 室温の 1xSSC 中で切片を室温に戻す。

13. 発色反応バッファー A 中に 10 から 15 分切片をいれる。

14. 発色反応バッファー B に約 5 分間浸ける。

15. 発色反応バッファー B に基質の NBT/BCIP を加えたものを切片の上にマウントし湿箱中で反応する。湿箱は暗所に置くか箱をアルミフォイルで包んで光が当たらないようにする。(反応は数時間から 3 日程まで)

16. 発色停止バッファー中で 30 分から 1 時間洗浄。

17. 封入。反応停止バッファーとグリセロールを 1 : 1 に混ぜたものを用いる。切片は冷暗所に保存する。

VII. オートラジオグラフィー

ハイブリダイゼーション後の RI の可視化の手法としてオートラジオグラフィーがある。これにはフィルムを用いるフィルムオートラジオグラフィーと写真乳剤を直接組織切片に塗る乳剤オートラジオグラフィーがある。

VII-1. フィルムオートラジオグラフィー

フィルムオートラジオグラフィーはハイブリダイゼーション後の組織切片にフィルムを圧着し組織切片からでてくる放射線によりフィルム上の銀粒子が感光する性質を利用するものである。適当な期間の露出後にフィルムのみを現像するものである。したがって一般に細胞レベルの高い解像度を得ることは困難であるが、1 週間程度の露出期間 (^{35}S の場合) で結果が得られる。また、フィルム中の乳剤の厚みが一定であるため定量性が良い。したがって定量性が求められる実験には乳剤よりフィルムの方が良いし、乳剤をかける前に実験がうまくいっているかどうかチェックに用いることが出来る。一般にコダックの XAR などのフィルムが良く用いられる。またベータ線の飛呈の短い ^3H などには、解像度を上昇させるために保護膜がないフィルムもある。これらの場合は現像には自動現像機を用いることはできず、皿現像となる。自動現像機にかけるとの出来るフィルムであれば、機械現像でよいが、その他の場合はフィルムに適合した現像液や定着液を用いる。

VI-2. 乳剤オートラジオグラフィー

細胞レベルでの高い解像度が要求される時には、乳剤オートラジオグラフィーを用いる。解像度が高い分 ^{35}S で約1カ月の長期に渡る露出が必要となる。乳剤をかけるポイントは均一に塗ることであるが、なかなかこれが難しい。乳剤の厚い所はバックが高くなるので、厚みにむらがあるとバックグラウンドにもむらができる。また、血管などの穴の多い組織では血管の内側などの組織の端がどうしても乳剤が厚くなり、バックグラウンドが高くなる傾向がある。組織切片標本の作成時の出来具合が大きく反応に現われる。一般に乳剤としては、コダックの NTB II か III, またはイルフォードの K-5 が良く用いられる。乳剤は発注してから手元に届くまでかなりの期間を要するため注意を要する。また、まれに感光している場合もある。

1. 乳剤は暗室内で使用時に温水(40度程度)で1:1に溶解希釈し、特定の乳剤瓶にいれ恒温槽(40度)の中で保温しておく。

2. スライドガラスをゆっくり乳剤に浸けそのままゆっくりと引き揚げる。

3. 標本のない裏面についた乳剤はティッシュペーパーなどで拭っておき乳剤を乾燥させる。この時標本を水平に静置もしくは立てかけて置いてもよい。

4. 乾燥したら暗箱にいれきっちりと遮光し、他の強い放射線に被爆しないところで保管する。(^{35}S で3週間から約1カ月)

5. 現像は D-19 などの現像液がもっとも一般的である。きっちりと現像液の温度を20度にして約5分浸ける。

6. 軽く水につけ現像液を洗う。

7. 定着液(フジフィックスなど)に5分以上15分まで浸ける。長期間定着液に浸けると銀粒子が変性する。

8. 15分以上水洗し乾燥させる。

9. カウンター染色が必要な場合には染色し脱水封入する。RNA プローブの場合 RNase 処理をするので組織の染色性が落ち良く染色できないことがある。

各種溶液作製法

スライドの準備

1. あらかじめ乾熱滅菌などで処理したものまたはエタノールで洗浄したスライドガラスを用意する。

2. スライドコート用シラン溶液(100 ml)

3-aminopropyltriethoxy-silane(Aldrich) 2 ml
アセトン 98 ml

3. スライドガラスをシラン溶液に数秒浸け、次に100%アセトン溶液に軽く浸け乾燥する。

4. オリゴプローブの場合は0.5%ゼラチン溶液に浸けるだけでも良い。RNA プローブの場合は高い温度で反応するためゼラチンは良くない。

固定液(オリゴ・RNA)

50 ml の水を70度に暖め 2-4 N の NaOH を数滴加える。4 g のパラフォルムアルデヒドを加え透明になるまで攪拌する。最後に 0.2 M PB(pH7.5)を 50 ml 加える。

前処理液(100 ml)(オリゴ・RNA)

triethanol amine 1.5 ml
Aceto Anhydride 250 μl
NaCl 0.9 g
H₂O 100 ml

ハイブリダイゼーションバッファー(10 ml)(オリゴ)

deionized formamide 5 ml
20 xSSC 2 ml
50 xDenhardt 200 μl
salmon testis DNA(10 mg/ml) 400 μl
dextran sulfate 1 g
H₂O 2.4 ml

ハイブリダイゼーションバッファー(100 ml)(RNA)

deionized formamide 50 ml
1 M Tris-HCl(pH 8.0) 2 ml
0.5 M EDTA 1 ml
NaCl 1.8 g
0.2 M NaPB(pH 8.0) 5 ml
50 xDenhardt 2 ml
salmon testis DNA(10 mg/ml) 2 ml
yeast tRNA(50 mg/ml) 1 ml
dextran sulfate 10 g
10% sarcosyl 2 ml

H₂O で最終 100 ml にあわせ-20度保存

RNase バッファー (3000 ml)

1 M TrisHCl (pH 8.0)	30 ml
0.5 M EDTA (pH 8.0)	30 ml
NaCl	87.7 g
H ₂ O で 3000 ml にあわせる	

RNA プローブ洗浄用バッファー (200 ml)

100% フォルムアミド	100 ml
20 xSSC	20 ml
1 M DTT	20 ml
H ₂ O	60 ml

発色バッファー A (500 ml) (non-RI の場合)

2 M Tris Base	25 ml
NaCl	4.5 g
H ₂ O	475 ml
conc. HCl で pH 7.5 に調整	

発色バッファー B (500 ml) (non-RI の場合)

2 M Tris Base	25 ml
NaCl	2.9 g
MgCl ₂	5 mg
H ₂ O	475 ml
conc. HCl で pH 9.0~9.5 に調整	

発色停止バッファー (500 ml) (non-RI の場合)

2 M Tris Base	2.5 ml
NaCl	4.5 g
EDTA	86 mg
H ₂ O	475 ml
1-2 N HCl で pH 7.5 に調整	

基質保存液 (non-RI の場合)

Nitro Blue Tetrazolium (NBT) 7.5 mg を 1 ml の 70% dimethyl formamide で希釈。
5-bromo-4-chlore-3-indolyl phosphate (BCIP) 50 mg を 1 ml の 100% dimethylformamide で希釈。
両保存液は -20度で保存し、使用時には 10 ml の発色バッファー B に NBT 45 μ l, BCIP 35 μ l 加え、発色液とする。

non-RI の場合の封入液 (2 ml)

発色停止バッファー	1 ml
グリセロール	1 ml

参 考 文 献

- 1) 塩坂貞夫, 木山博資, 神経化学研究の先端技術プロトコール (I. 分子組織化学), 厚生社, 1994.
- 2) 遠山正弥, 塩坂貞夫, 木山博資, バイオマニュアルシリーズ 9, 蛋白質・核酸分子の in situ 同定法, 羊土社, 1994.