

・ in situハイブリダイゼーション

● 目的

- 遺伝子の発現パターンをmRNAレベルで知ること

● 原理

- 目的遺伝子の配列と相補的な配列をもったRNAを合成。これをRNAプローブという
- プローブを組織に作用させると、標本上のmRNAとハイブリダイズする
- 抗体を使ってプローブを染色する

● 標識と検出

- ジゴキシゲニン (DIG) でUTPを標識したものをつかってプローブを合成
- アルカリフォスファターゼ (Al-P) で標識した抗DIG抗体でプローブを検出
- Al-Pの基質NBT-BCIPを使って紺色に発色させる

● 作業のアウトライン

- 胚をアルデヒド固定し、メタノールで低温保存しておく

● 第1日

- 緩衝液に戻す
- プロテアーゼ処理し、再固定、緩衝液で洗う
- プレハイブリダイズ
- ハイブリダイズ (一晩)
- 同時に不要な胚で抗体を吸着処理 (一晩)

● 第2日

- 予洗
- stringency wash
- 緩衝液で洗う
- ブロッキング
- 抗DIG抗体 (数時間～一晩)

● 第3日

- 緩衝液で洗う
- 発色

● 第0日

- 固定
 - 胚を4%ホルムアルデヒド-PBSで室温で2時間または4°Cで一晩固定。dechorionate
- 脱水
 - メタノール、室温で10分間
 - メタノール、-20°Cで1時間以上

● 第1日

- バスケットをラックに装着し、100%メタノールを加え、胚をバスケットに移す
プレアブソープション用に不要な胚もいっしょに処理
- 再水和
 - 75%メタノール-25%PBS、5分間
 - 50%メタノール-50%PBS、5分間
 - 25%メタノール-75%PBS、5分間
 - PBST、5分間、4回
- 消化
 - 2.5µg/ml Proteinase K - PBST、室温で：
 - ~18hpf未満：なし
 - 18~30hpf：5分間

- 30~66hpf : 10分間

- 再固定
 - 4%ホルムアルデヒド-PBS、20分間
- 洗浄
 - PBST、5分間、4回
- プレアブソープション
 - 不要な胚をバイアルに移し、5ml BLOCKと12.5μl 抗DIG抗体を加えて軽く混和。4°Cで一晩
- プレハイブリダイゼーション
 - シンチ管に500μl HYBを加え65°Cにしておく
 - バスケットをシンチ管に移し、2~3時間
- ハイブリダイゼーション
 - プロブをHYBで10~20倍に希釈して500μlにし、シンチ管に入れ、65°Cにしておく
 - バスケットごと胚を移し、一晩

● 第2日

- 洗浄
 - 75%ホルムアミド、2×SSC、65°C、10分間
18.75 mlホルムアミド、5 ml 20× SSC、H₂O加えて50 ml
 - 50%ホルムアミド、2×SSC、65°C、10分間
12.5 mlホルムアミド、5 ml 20× SSC、H₂O加えて50 ml
 - 25%ホルムアミド、2×SSC、65°C、10分間
6.25 mlホルムアミド、5 ml 20× SSC、H₂O加えて50 ml
 - 2×SSC、65°C、10分間
5 ml 20× SSC、H₂O加えて50 ml
 - 0.2×SSC、65°C、30分間×2回
0.5 ml 20× SSC、H₂O加えて50 ml
 - 0.15×SSC、PBST、室温、5分間
0.375 ml 20× SSC、12.5 ml PBST、H₂O加えて50 ml
 - 0.1×SSC、PBST、室温、5分間
0.25 ml 20× SSC、25 ml PBST、H₂O加えて50 ml
 - 0.05×SSC、PBST、室温、5分間
0.125 ml 20× SSC、37.5 ml PBST、H₂O加えて50 ml
 - PBST、室温、5分間
- ブロック
 - 45 ml BLOCKに移し、室温、1時間
- 抗体
 - プレアブソープした抗体5 mlを加えて混和し、4°Cで一晩（または室温で2~3時間）

● 第3日

- 洗浄
 - PBST、1~2分間×2回
 - PBST、15分間×5回
 - アルカリフォスファターゼ・バッファ、5分間×3回
 - マイクロタイタープレートに移す
- 染色
 - 染色液を加え、室温、30分間~2時間（または4°Cで一晩）
 - 染まるまでに染色液が青くなってきたら、交換
 - 染まったらPBSTで洗浄し、検鏡して確認
 - 固定液で固定して染色を止める
 - 10%グリセリン-PBST、4°Cで保存

● 溶液

- PBS
 - タカラのタブレットで作る

- PBST
 - 0.1% Tween-20-PBS
- BLOCK
 - 2%正常ヤギ血清、0.1%魚ゼラチン-PBST
- HYB
 - 25 ml ホルムアミド
 - 12.5ml 20× SSC
 - 50μl 50mg/ml ヘパリン
 - 500μl 50mg/ml torula RNA
 - 200μl 20% Tween-20
 - 460μl 1M citric acid, pH6.0
 - H₂O加えて50ml
- アルカリフォスファターゼ・バッファ
 - 20ml 1M Tris-HCl, pH9.5
 - 10ml 1M MgCl₂
 - 4ml 5M NaCl
 - 2ml 20% Tween-20
 - 2ml 20% Triton X-100
 - 240μg levamisole
 - H₂O加えて200ml
- 染色液
 - RocheのNBT/BCIPタブレットを10ml H₂Oに溶かす
 - 0.1ml 20% Tween-20
 - 0.1ml 20% Triton X-100
 - 量が多すぎるときは、タブレットを割って使う