

Whole mount ISH 2 重染色- Hybridization と検出

準備

発現強度の高い遺伝子=FITC-probe/Fast Red、発現強度の低い遺伝子=DIG-probe/NBT-BCIP
100mM グリシン, pH2.2 (HCl で合わせる)、0.1% tween-20 (酸性条件で AP を不活化させる)

染色

- 1) MtOH 保存サンプル (1 試験区に 5 サンプル程度) を PBSTw に置換
MtOH に等量の PBSTw を加える。5 分後、PBSTw で倍に希釈 (計 4 回、5min 間隔)。最後に PBSTw に置換 (卵膜がある場合、ピンセットで除去)
(色素を除く必要がある場合、6% H₂O₂/PBSTw で漂白 (30min~6h)。漂白後、PBSTw で洗浄, 5min x 3)
- 2) Proteinase K (PK) 消化
PK 原液 (20mg/ml) を PBSTw で 2,000 倍希釈して使用
37C, 1-20min (体節期胚は 5min、孵化胚は 10min、仔魚は 20 min)
- 3) 4%PFA, 10min 固定 (PK の不活化)
- 4) PBSTw で洗浄. 5min x 4
- 5) プレハイブリ. 200~500ul HB4. 65C, 1-5h
- 6) ハイブリ. 1ul DIG-probe + 1ul FITC-probe /200ul HB4. 65C, O.N.
- 7) 50% formamide in 2xSSCTw で洗浄 (1ml/tube) . 30min x 2 at 65C
- 8) 2xSSCTw で洗浄. 15min x 1 at 65C
- 9) 0.2xSSCTw で洗浄. 30min x 2 at 65C
- 10) Blocking solution でインキュベート. 400ul/tube, 1h at RT
- 11) 吸収 AP 標識-抗 DIG 抗体を 10 の液に 16ul 加える (最終抗体濃度= x 5,000) . 2h at RT or O.N. at 4C
- 12) PBSTw で洗浄. 15min x 8
- 13) AP buffer でインキュベート. 5min x 2
- 14) NBT/BCIP substrate で発色. 25 C, 30min ~O.N. depending on coloration
20ul NBT/BCIP stock solution + 1ml AP buffer
- 15) PBSTw で洗浄, 5min x 3
- 16) 100mM glycine, pH 2.2, 30min
- 17) PBSTw で洗浄, 5min x 3
- 18) Blocking solution でインキュベート. 400ul/tube, 1h at RT
- 19) 吸収 AP 標識-抗 FITC 抗体を 10 の液に 16ul 加える (最終抗体濃度= x 5,000) . 2h at RT or O.N. at 4C
- 20) PBSTw で洗浄. 15min x 8
- 21) 0.1M Tris-HCl, pH8.2 でインキュベート. 5min x 2
- 22) Fast Red substrate で発色. 25 C, 30min ~O.N. depending on coloration
Dissolve Fast Red tablet in 2ml 0.1M Tris-HCl, pH8.2
- 23) PBSTw で洗浄, 5min x 2
- 24) 4% PFA, 20min
- 25) PBSTw で洗浄, 5min x 3
- 26) 等量の MtOH を加え置換していく。 x 4, 100%MtOH x 1
- 27) 50% glycerole/CMEF
- 28) 80% glycerole/CMEF