

試薬の調製

プレハイブリ液 (-20°C で保存可)

ホルムアミド	500 μ l	50%
20X SSC	200 μ l	4x
50X Denhardt's solution (WAKO 043-21871)	20 μ l	1X
DEPC DW	280 μ l	

Total 1000 μ l Final

ハイブリバッファ (-20°C で保存可)

ホルムアミド	500 μ l	50%
20X SSC	200 μ l	4x
10% SDSC (WAKO 192-10382)	2 μ l	0.02%
20mg/ml tRNA Typell-C yeast	50 μ l	1mg/ml

(SIGMA R6875)

50X Denhardt's solution	20 μ l	1X
-------------------------	------------	----

(WAKO 043-21871)

0.5M EDTA (pH8.0 by NaOH)	10 μ l	5mM
---------------------------	------------	-----

50%硫酸デキストラン	200 μ l	10%
-------------	-------------	-----

DEPC DW	18 μ l	
---------	------------	--

Total	1000 μ l	Final
-------	--------------	-------

サンプルの固定、包埋、薄切

組織の固定

1. ブアン固定液の調製; 飽和ピクリン酸 15 : ホルマリン 5 : 酢酸 1 (直前に調製)
2. 4 °C、1 夜固定
3. 100%エタノールで 10 分、2 回洗浄
4. 100%エタノールで-20°C 保存

パラフィン包埋

1. 脱水 : 80, 90, 100, 100% EtOH 各 30 分、4 °C
無水 EtOH 1 夜、4 °C
2. 透徹 : キシレン 1、キシレン 2、キシレン 3 各 20 分
3. パラフィン 1 15 min
パラフィン 2 15 min
パラフィン 3 15 min
4. 包埋 : バランストレイ (S) を使う

切片

1. 8 μm の切片に薄切
2. MAS コートスライドガラス上に DEPC DDW をのせ切片を伸展させる
(筆など ISH 専用にし、手袋をはめて行う)
3. 1 晩乾燥させた後、65°C のオーブンに 15 min 置き、パラフィンを一度溶かす
4. 冷蔵庫で保存

ハイブリ操作

1. 脱パラ： キシレン1、キシレン2各10 min、

EtOH1 100%1, 100%2 各5min, 90%, 70% (希釈は DEPC DW) 各1 min,

DEPC DW 10min x 2, PBS 10min (以降 PBS は DEPC 処理したもの)

↓

2. Proteinase K (Takara,9033, 20 mg/ml) 消化

10 µg/ml (2000 倍希釈) in PBSTw 37°C, 15 min

(サンプルによって至適条件が異なるので、1-100µg/ml の範囲でチェックが必要)

↓

2. PBS, 5 min 洗浄

↓

3. 4% PFA, 10 min 固定

↓

4. PBS 5 min x 2、洗浄

↓

5. プレハイブリ 30-60min 室温

プレハイブリの間に、モイストチェンバーを 10% H₂O₂ で処理する

↓

6. ハイブリ：1 μ l プローブストック液/200 μ l ハイブリバッファ、50°C、1夜

スライドグラスにグラスウールの糸を3本置き（カバーと切片の間に隙間を明けハイブリ液が切片全面に広がるようにするため）、probeを加えたハイブリ液を滴下し(22x40mm で 70 μ l, 22x60mm カバーで 110 μ l 必要)、ハイブリカバーを乗せる。

ハイブリは 50% formamide/Depc DW を入れたモイストチャンバーで行う。

↓

7. 5x SSC (50°C) 中でカバーをはがす

前もって、5x SSC をスライド壺に入れ、50°C にしておく。カバーのついたスライドを 5x SSC に入れると、カバーは自然にはがれ落ちる。

ネガティブコントロールのスライドは別の瓶で洗浄する。

↓

8. 50% formamide-2x SSC、50°C、30 min x2

↓

9. 2X SSC、50°C、30 min

↓

10. 0.2X SSC、50°C、30 min x2

抗体と発色操作

1. ブロッキング：ブロッキング液（Wish と同じ）を切片に乗せる、0.5-1 時間、室温（モイストチェンバー内で保湿）

↓

2. 抗-DIG 抗体：8 μ l 吸収抗体（Wish と同じ） + 200 μ l ブロッキング液、3 時間、室温（モイストチェンバー内で保湿）

↓

3. Wash in PBSTw、5 min x3

↓

4. Wash in PBS、5 min

↓

5. AP buffer（100mM NaCl, 50mM MgCl₂, 100mM T-H9.5）、5 min

↓

6. 基質で発色：20 μ l NPT/BCIP + 1,000 μ l AP buffer

ウエットチャンバーを暗所（室温）で静置する。15 分から 1 時間ぐらいおいて切片がやや紫色になってきたら PBS で洗浄。途中で触れると、シグナルが滲んだ様になる（すぐに青くなるようならプローブや抗体濃度が高すぎるか切片の出来が良くない）。

↓

7. 4%PFA、10min

↓

8. 水洗、10min

↓

9. 脱水してキシレンを通しバルサムで封入