

アカネズミ (*Apodemus speciosus*) 染色体特異的 DNA プローブ

を用いた FISH による染色体ペインティング法

- (1) 染色体標本の作製
- (2) プローブ DNA の標識
- (3) or (3') 染色体標本の変性
- (4) プローブ DNA の変性
- (5) ハイブリダイゼーション
- (6) 染色体標本の洗浄
- (7) 染色体標本の染色及び洗浄

(1) 染色体標本の作製

1. コルセミド処理^{*1}したマウス脾臓細胞浮遊液を遠心管に回収し、300g で3分間、室温にて遠心を行う。遠心後、上清を捨てる。
2. 細胞ペレットに 5 ml の 0.075 M KCl を加え、細胞に傷をつけないようにするため、先端を火で炙って滑らかにしたパスツールピペットで静かに攪拌し(ここでピペッティングをしっかりと行い細胞を単一にしておくことが重要)、12 分間室温において低張処理を行う。
3. 固定液(酢酸:メタノール=1:3)を 0.5 ml 加え、パスツールピペットで軽く混和し、室温で 15 分間静置する。
4. 更に 1 ml の固定液を加え、パスツールピペットで軽く混和し室温で5分間静置する。
5. 最後に 7ml の固定液を加え、静かに全体を攪拌し、細胞を固定する。
6. 1200 rpm で 3 分間遠心し、上清を捨て、新たに固定液を 10ml 加えて攪拌する。
7. 6.の作業をもう一度行う。
8. 1200 rpm で 3 分間遠心し、上清を捨て、保存する場合は固定液を 10ml 加えて攪拌し、冷凍庫(-30℃)で保存する。
9. 続けて染色体標本作製する場合は、更に 1200 rpm で 3 分間遠心し、上清を捨て、適当な細胞濃度(およそ 5×10^6 cells/ml)になるように固定液を加えて懸濁し、以下の方法で染色体標本作製する。
10. スライドガラスは最低1週間以上 100%エタノールに浸しておく。
11. 100%エタノールに浸したスライドガラスを取り出し、キムワイプで表面を磨く。
12. スライドガラスに固定液を1滴落とし、その上に 9.の細胞懸濁液を1-2滴落とし、その後、水で湿らせたペーパータオルの上にスライドガラスを置く。一枚標本作製したら、顕微鏡下で細胞数を確認し、更に標本作製する。
13. そのまま24時間自然乾燥させる。
14. スライドガラス上に細胞が広がっている位置が分かるように、ガラスペンで線を引く。
15. サンプル名を記入したラベルをスライドガラスに貼る。
16. -80℃で保存

^{*1} Radiation Research vol.171, 2009 (pp. 290 - 301)

(2) プローブ DNA の標識

1. ニックトランスレーションキット (SIGMA: Nick Translation Kit cat.no.10976776001)、ビオチン-16-dUTP (SIGMA: Biotin-16-dUTP cat.no.1109370910)、ジゴキシゲニン-11-dUTP(SIGMA: Digoxigenin-11-dUTP cat.no.11573152910)を用いる。
2. 各試薬を以下の割合で 1.5ml エッペンドルフチューブに入れ、混和する。

10 x buffer	2 μ l
dGTP, dATP, dCTP (0.4mM 各 2.0 μ l)	6 μ l
Biotin-16-dUTP or Digoxigenin-11-dUTP	1 μ l
Probe DNA (750ng)	x μ l
Enzyme	3.5 μ l
ddH ₂ O	7.5 - x μ l
Total	20 μ l
3. 軽く混和後、15°Cで2時間反応させる。
4. チューブを 65°Cで 10 分間インキュベートし、酵素を失活させる。
5. 5 分間室温で冷ます。
6. 軽く遠心した後、4M 酢酸アンモニウムを 2.9 μ l とアカネズミ Cot-1 DNA(1 μ g/ μ l)*¹を 3.3 μ l を加える。更に 100%エタノールを 100 μ l 加える。
7. タッピング後、軽く遠心をして-80°Cで 20 分間静置する。
8. 微量高速遠心器を 4°Cにセットし、15,000 rpm で 20 分間遠心後、上清を除去し、蓋を開けた状態でエタノールがなくなるまでおよそ 5 分間 DNA を自然乾燥させる。
9. 10 μ l のホルムアミドを加え、ピペッティング(100 回)し、DNA を完全に溶かし、使用するまで 4°Cにて保存する。

*¹(株)クロモソームサイエンスラボに作製依頼

繰り返し配列をブロックするための不均衡な DNA mixture。作製は(株)クロモソームサイエンスラボに依頼した。アカネズミの肝臓より抽出し、Milli-Q 水に懸濁した DNA 10mg からおよそ5本のチューブ (1 μ g/ μ l, 500 μ l/チューブ) が作製できた。

(3) or (3') 染色体標本の前処理及び変性

標本を熱変性する場合は(3)の手順、アルカリ変性をする場合は(3')の手順に従う。

(3) 標本の熱変性

1. 染色体標本を -80°C に保存した場合は、冷凍庫から取り出し水滴がなくなるまで室温に放置する。
2. 標本上に 50 ng/ml の Proteinase K (Roche cat.no.03115852001 Proteinase K, recombinant PCR Grade)を 100 μl 滴下し、その上から 24 x 40 mm のカバーガラスを気泡が入らないように被せる。
3. あらかじめ 37°C にセットした ABBOTT MOLECULAR ThermoBrite^{*1} に置き 7 分 30 秒間処理する。
4. 処理後、70%エタノールを入れたコプリンジャー内で 50 回ほど標本を上下した後、3 分間浸す。
5. 3 分後、標本を 100%エタノールの入ったコプリンジャーに移して、50 回上下した後、3 分間浸す。
6. 標本を取り出し、標本が乾燥するまで室温に置く。
7. ラックに立てた標本を $63 - 65^{\circ}\text{C}$ にセットした恒温器^{*2}に入れて、2時間ハードニングを行う。
8. 62°C に保温した 70%ホルムアミド/2 x SSC に標本を入れて、2 分間変性させる。標本を入れた後、温度が下がらないように、70%ホルムアミド/2 x SSC の入ったコプリンジャーは 62°C にセットしたウォーターバスに入れて保温しておく。

*70% ホルムアミド/2 x SSC の組成

ホルミアミド	35 ml
dd H ₂ O	10 ml
20 x SSC ^{*3}	5 ml

*標本を入れる前に温度計を直接 70% ホルムアミド/2 x SSC に入れ、必ず温度をチェックする。

*温度が下がるので、標本は 1 回につき 3 枚までしか入れない。

*変性時間は厳守する。

9. 氷冷した 70%エタノールを入れたコプリンジャーに素早く移し、5 分間浸す。
10. 取り出す時に 70%エタノール中で標本を 30 回程上下し、完全にホルムアミドを

除去し、室温の 100%エタノールに移して 5 分間脱水する。

*100%エタノールに移す時、ペーパータオル上で標本を傾けてよく 70%エタノールをきる。

11. 取り出す時に 100%エタノール中で標本を 50 回程上下する。

ペーパータオル上に置いてエタノールがなくなるまで、自然乾燥する。

*1 ABBOTT MOLECULAR ThermoBrite は FISH 専用の恒温器で標本とプローブを同時に熱変性が可能である。

*2 温度調整と乾燥ができるものであれば良い。

*3 20 x SSC 組成

3M NaCl

0.3M Sodium Citrate·2H₂O

(1N HCl で pH7.0 に合わせてオートクレーブ)

(3') 染色体標本のアルカリ変性

1. 染色体標本を-80℃から取り出し、水滴がなくなるまで室温に放置する。
2. 標本上に 50 ng/ml の Proteinase K を 100 μl 滴下し、その上から 24 x 40 mm のカバーガラスを気泡が入らないように被せる。
3. あらかじめ 37℃にセットした ABBOTT MOLECULAR ThermoBrite に置き 7 分 30 秒処理する。
4. 処理後、70%エタノールを入れたコプリンジャーに入れて 50 回ほど標本を上下した後、3 分間浸す。
5. 3 分後、100%エタノールの入ったコプリンジャーに標本を移して、50 回上下した後、3 分間浸す。
6. 3 分後、余分な液をキムワイプで拭き取る。
7. 室温で 10 分間自然乾燥する。
以後の操作は室温で行う。
8. 染色体標本を 0.07N NaOH の入ったコプリンジャーに入れ、1分間浸す。
9. 染色体標本を静かに取り出し、0.1 x SSC の入ったコプリンジャーに1分間浸す。
10. 次に 2 x SSC の入ったコプリンジャーに入れて、1分間浸す。
11. 更に 70%エタノールの入ったコプリンジャーに移して、1分間浸す。
12. 70%エタノールから取り出す前に10回程標本を上下し、100%エタノールの入ったコプリンジャーに移して、1分間浸す。

13. 取り出す前に10回程染色体標本上下し、余分な液をキムワイプで取り除き、10分間自然乾燥する。

(4) プローブの変性

1. (2)でホルミアミドに溶解したプローブ DNA を 75°C にセットした TITEC Dry Thermo Unit (DTU-1B) に入れて、10 分間インキュベートして熱変性をする。
2. チューブを素早く氷水中に入れて、ハイブリダイゼーションまで静置する(10分間以上)。

(5) ハイブリダイゼーション

1. 熱変性したプローブ DNA 10 μ l に 10 μ l のハイブリダイゼーションバッファーを加え、よく混和する(合計 20 μ l)。

*ハイブリダイゼーションバッファーの組成

	割合
50%硫酸デキストラン	2
ddH ₂ O	1
20 x SSC	1
20 mg/ml ウシ血清アルブミン (Roche cat.no.10711454001)	1

*ハイブリダイゼーションバッファーは使用直前に作製。

*50%硫酸デキストランは粘性が強いので、ハサミで 1~2 mm 程先をカットしたマイクロピペットチップを使用。ピペットはゆっくりと操作する。

2. 1.の混合液を(3)で熱変性した染色体標本に滴下する。
3. 24 x 32 mm のカバーガラスを気泡が入らないように被せる。
4. プローブ DNA が均一にカバーガラス全体に広がるまで待つ。
5. 液が広がったら、コクヨのペーパーボンドでカバーガラスの周りをシールする。
6. ボンドが乾いたら、湿気を含んだ密閉容器(ddH₂O を含ませたペーパータオルを底に敷く)に標本を置き、37°C で 1 晩(15~20 時間)ハイブリダイズさせる。

(6) 染色体標本の洗浄

これ以後の一連の操作に於いては、標本を乾燥させないように注意し、更に遮光して行う。

1. カバーガラスを取り除き、染色体標本を 37°C の 50%ホルムアミド/2 x SSC の入ったコプリンジャー内に 15 分間静置する。温度が下がらないようにコプリンジャーは 37°C にセットしたウォーターバスで保温しておく。

*50% ホルムアミド/2 x SSC の組成

ホルミアミド	25 ml
dd H ₂ O	20 ml
20 x SSC	5 ml

2. 15 分後、標本を取り出し 2 x SSC を入れたコプリンジャー内で 20 回上下させて、完全にホルムアミドを取り除く。
3. 新しい 2 x SSC の入ったコプリンジャーへ移し、室温で 5 分間静置する。
4. 標本を取り出し 4 x SSC の入ったコプリンジャーへ移し、室温で 5 分間静置する。

(7) 染色体標本の染色及び洗浄

1. 500 μ l の 1% BSA/4 x SSC 液に 1 μ g/ μ l の Alexa Fluor 488 conjugate 標識 avidin 原液 1.0 μ l あるいは 0.2 μ g/ μ l の Rhodamine Fab fragments 標識抗 Digoxigenin 原液 2.5 μ l を加え、よく攪拌して染色液とする(二重染色の場合は上記分量を同時に入れる)。

* 標本1枚につき 100 μ l 必要とする。枚数分に合わせて作製し、遮光しておく。

Avidin, Alexa Fluor 488 conjugate

Life technologies Cat.no. A21370

Anti-Digoxigenin-Rhodamine Fab fragments

Roche Cat.no. 11207750910

2. (6)で 4 x SSC に 5 分間静置した標本を 20 回ほど上下して取り出す。
3. 標本の余分な液をキムワイプで拭き取る。
4. 標本上に 100 μ l の染色液をのせ、気泡が入らないようにしてパラフィム

24 x 40 mm を被せる。

5. 湿気を含む密閉箱に入れ、37°Cで1時間反応させる。

以下の洗浄操作は遮光状態にして室温で行う。

5. 標本からパラフィルムを除き、コプリンジャー内の4 x SSCで20回上下して洗う。

6. シェイカー上に置いた新しい4 x SSCの入ったコプリンジャーの中へ、6.の標本を入れて5分間洗浄する。

7. 次にシェイカー上に置いた0.1% Nonidet P-40/4 x SSCの入ったコプリンジャーの中へ、7.の標本を入れ同様に5分間洗浄する。

*0.1%NP-40/4 x SSC 溶液の作製には専用ビンを用いる。

*NP-40 は粘性が高いのでチップの先をはさみでカットして使用する。

4 x SSC	50 ml
---------	-------

NP-40	50 μ l
-------	------------

8. 更にシェイカー上に置いた新しい4 x SSCの入ったコプリンジャーの中へ、8.の標本を入れ5分間洗浄する。

9. 5分後標本を20回上下して洗浄してから、シェイカーの上に置いた2 x SSCの入ったコプリンジャーへ移し、標本を5分間洗浄する。

10. Metasystem の DAPI/Antifade とコスモバイオ DAPI 溶液を混合して染色液を作製する。

*DAPI は粘性があるので、ハサミで先を少しカットしたチップを使用する。

*1枚あたり25 μ l 混合染色液使用

DAPI/Antifade (250 ng/ml)	10 μ l
---------------------------	------------

(Metasystem D-0902-500-DA)

Immunoselect Antifading mounting medium DAPI	15 μ l
--	------------

(コスモバイオ:SCR-038448)

11. 10.の標本を20回ほど上下してから取り出し、余分な液をキムワイプで拭き取る。

12. 標本に染色液25 μ l 滴下する。

13. 24 x 40 mm のカバーガラスを気泡が入らないように被せる。

14. 遮光状態にして、室温で10分静置する。

15. 10分後ペーパータオル等で標本を包み、手のひらで軽く押して余分な液を取り除く。

16. ペーパーボンドでカバーガラスの周りを薄くシールする。

17. 蛍光顕微鏡で撮影する。

著者名: 久保田 善久

所属名: 国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構 放射線医学総合研究所 福島再生支援本部 環境影響研究チーム

日付: 8/20/2018

文献: マウスラボマニュアル: ポストゲノム時代の実験法 第2版 p108 – p133

蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (執筆担当 松田洋一)

Tanaka, K et.al, Radiation Research, 171, 291–301, 2009

Kawagoshi, T.et.al, Environ. Sci. Technol., 51(8), 4632–4641, 2017

注意: 上記のプロトコールより、アカネズミに特化した FISH 法に変更