

## in situの蛍光二重標識法 (ショウジョウバエ通信15号より 1998.10月)

大城 朝一

国立精神神経センター神経研究所 遺伝子工学研究部内  
科学技術振興事業団 戦略的基礎研究「脳を知る」

異なる遺伝子の発現を染め分けて検出する事はよく行われている手法である。多くの場合、通常の抗体反応又は抗体反応とin situ法との組み合わせで済むことが多いと思われるが、availableな抗体がない場合、どうしてもAlkaline phosphatase 発色のin situ法だけで二重染色を行わなければならない場合が生ずる。この場合、一般には発色基質としてX-phosphate (BCIP/NBT 可視、紫)とVector Red (可視、赤)の併用が行われるが、色が近いだけに発色の重なりをきれいにdemonstrationできない。そこで蛍光発色でなんとか検出した気持ちに駆られることになるが、最近になって蛍光を発する基質やdigoxigenin detection system、TSA 増幅法の登場により可能になってきた。

以下に述べる蛍光二重 in situ 法は、これら最近用いられるようになった手法(又は試薬)をいくつか組み合わせできたものであり、BCIP/NBT を用いたin situの発色法や通常の抗体染色技術といった基本技術を習得された方ならば操作を多少変更するだけなのですぐに行なえるはずである。

というわけで順を追った細かいプロトコルを述べるのではなく、筆者がいろいろ試してみても気付いた点を中心に述べることにしたい。基本的な手順は各自使い馴れたin situ/抗体染色のプロトコルに従ってもらいたい。ただし、biotinプローブin situはかなり難しい事を先に明記しておく。すべての点でbestな実験を行わないとシグナルは見えてこない。筆者の場合、branchless 遺伝子のin situで成功しているがそれでも4回に2回は失敗したことを正直に申し上げる。embryoもメタノール保存したものを用いずに、回収したばかりのfreshなものを使うなど注意を要する。

筆者はプローブとしてRNAプローブを用いているので、RNAプローブを用いたショウジョウバエ胚のwhole mount in situ法について述べる。

### 1. 概略

基本的にはdigoxigenin及びbiotinを用いて異なる二種類のRNAプローブを作成し、組織中のmRNAにhybridizeさせ、それぞれ抗digoxigenin抗体、strept avidin-FITCで検出する。抗digoxigenin抗体はAlkaline phosphataseを結合させたものを用い、蛍光性のHNPP/Fast Red (TRITC, Cy3と同様に検出できる)を基質としてシグナルを検出する。biotinプローブのほうはそのままstrept avidin-FITCで検出するには感度が低すぎるので、tyramidyle-biotineを用いたTSA-indirect法でbiotin量を増幅して、avidin-FITCを用いて検出する。TSA-indirect法とはbiotinのまわりにラジカル化したtyramidyle-biotinをべたべたくっつけて、biotinの量を局所的に増幅させる方法である。もともとは通常の抗体染色でbiotin化二次抗体を使用する際の感度を上げるために使用されていた。

### 2. 準備する試薬類について

- 1) RNA プローブ作成に関しては、Boehringer社からいくつかKitが発売されている。特に、DIG RNA Labeling Kit (Boehringer Mannheim, #1175 025)があれば便利。このKitにはRNAプローブ作成に必要な試薬(T7/SP6 RNA polymerase、DIG labeling Mix、Buffer等)が全て揃っている。さらにBiotin RNA Labeling Mix (Boehringer Mannheim, #1 685 597)を買い足してLabeling Kitに付属のDIG labeling Mixの代

わりに使用すればそのままBiotin 化RNA プローブも作成できる。

- 2 ) Alkaline phosphataseの基質であるHNPP/Fast Red は Boehringer 社から入手 ( HNPP Fluorescent Detection Set , Boehringer Mannheim # 1 758 888 ) 。
- 3 ) TSA-indirect はNEN から入手可能 (NEN life science products #NEL700A ) 。

### 3 . 実際の手順について

#### 1 ) RNA transcription

- ・ DIG RNA Labeling Kit を用いて付属の説明書通りに作成。 template DNA 2  $\mu$ gを20  $\mu$ lスケールで転写反応。 だいたい template の5倍はできる。 RNA sizing ( オプション )、エタ沈 x 2の後20  $\mu$ l H<sub>2</sub>O に溶かす。 - 20 保存。
- ・ Biotin RNA プローブの場合、 Labeling Kit に付属のDIG labeling Mixの代わりにBiotin RNA Labeling Mixを同量、同濃度で使用する。 DIGの場合と全く同様に処理、保存。
- ・ 筆者は水、 buffer等 についてはDEPC処理なしオートクレーブのみだが、 気になる方はDEPC処理もどうぞ。 ただし、転写反応に用いる水はDEPC 処理しなほうがよい。
- ・ またpBluescript にクローン化したプラスミドをtemplate にした場合、 T7からの転写の効率はT3に比べ悪いような気がする ( T7配列の周りの高次構造が原因 ? )。 この場合、 Insertを逆さまに入れ直したクローンを作成してT3から転写させると良い結果が得られたこともあった。
- ・ 転写産物の一部を取って泳動し、チェックする。 あまり見えなくても案外うまく行くことが多いので、諦めてはいけない。
- ・ 正しくはちゃんとプローブの出来を定量すべきだが、 筆者はいつもHybridization Buffer 100  $\mu$ lに対してプローブ1  $\mu$ lを用いてうまくいっている。 もちろんプローブは大過剰加えているはずなのでHybridization Buffer は最低3回は使いまわしている。

#### 2 ) 組織の固定

- ・ このステップが一番重要。 組織に多量に含まれるRNaseをいかに早く確実に失活させるかに注意を置きたいところ。
- ・ 大部分のプロトコールでは4% paraform aldehyde による二回の fixの操作を入れている。 一回目と二回目の fix のあいだにPBS中で抗体染色を行おうと試してみたことがあったが、 in situのシグナルは全く見えなくなった。 間をいれずさっさとpost fixを行うのがよい。 またfix があまいと組織中のbiotinが残ってバックグラウンドの原因になる。
- ・ 一度めの固定の後に-20 メタノールで保存することもできるが、 biotinプローブでのin situ ではお勧めしない。 またそのような保存を行うと、 hybridization後にTOTO3 (Morecular Probes社)で核染色を行っても核が染まらなくなるので注意。 また筆者はプローブの浸透をよくするためとされるproteaseK 処理は行っていない。

#### 3 ) ハイブリダイゼーション

- ・ biotinプローブでまずハイブリダイゼーションを行い ( オーバーナイト)、 その後ハイブリダイゼーションバッファーを除いて、 DIGプローブでハイブリダイゼーションを行う ( オーバーナイト)。 両方いっぺんに行うことも可能であろうが、 筆者は念のために分けて行っている。 プローブは1  $\mu$ l/100  $\mu$ lハイブリダイゼーションバッファーが適当。

#### 4) ハイブリダイゼーションバッファの組成

- Hybridization Buffer としては、Denhardt'sや硫酸デキストランを含むかなり粘性の高いもの(A)と、Tautz and PfeiffleのOriginalプロトコールにあるヘパリンを使用したかなりさらさらしたもの(B)と二種類ある。RNAのhybridizationの効率からいうと前者が断然強いシグナルが得られる。しかし粘性の高いBufferを使用した場合、in situ後に通常の抗体反応も同時に行おうとすると抗体反応があまりうまくいかないことがあった。同様にTOTO-3で in situサンプルを染色しようとする色素がほとんど内部に侵入できず色素が組織の表面にべたべた蓄積した。粘性の低いBufferを使用した場合はこれらのことが大分回避できる。ただし、in situのシグナルはかなり減少する。
- Denhardt'sは古くなると沈澱を生じてしまう。沈澱が生じたbufferを用いるとTSA-indirect でbiotinを増幅した際、非特異的バックグラウンドの上昇を招く。filtrationしたものをを使うか、小分けしておいて凍結融解をくり返さないようにする。

#### Hybridization Bufferの組成

( A ) 10mg/ml tRNA	100 $\mu$ l
1M Tris.HCl (pH8.0)	20 $\mu$ l
500mM EDTA (pH8.0)	5 $\mu$ l
20 x Denhard's	50 $\mu$ l
5M NaCl	60 $\mu$ l
Formamide	500 $\mu$ l
50% Dextran Sulfate	100 $\mu$ l
H2O	115 $\mu$ l
total	1ml

( B ) Formamide	500 $\mu$ l
20 x SSC	250 $\mu$ l
10mg/ml Salmon sperm DN	10 $\mu$ l
10mg/ml heparin	5 $\mu$ l
Tween 20	1 $\mu$ l
add H2O	to total 1ml

- ハイブリの温度は50 で、12-16hr行っている。先にも述べたようにHybridizationBuffer 100  $\mu$  lに対し、プローブ 1  $\mu$  lを使用している(もちろん各自で最適な濃度を見つけて行ってもかまわない)。(B)を用いた場合はもう少し濃くする。

#### 5) 洗い

- 2 x SSC, 50% Formamide でwash 20min x 3 at 50
- 20  $\mu$  g/ml RNaseA 処理 in 10mM Tris/HCl, 500mM NaCl
- 2 x SSC, 50% Formamide でwash 20min x 3 at 50
- 1 x SSC, 50% Formamide でwash 20min x 3 at 50
- 1XSSC, 50% Formamide でwash 10min x 3 at R.T.
- PBS+Triton x 0.1% にゆっくり置換。

- PBS+Triton x 0.1% でwash 10min x 3
- Blocking ~

#### 6) 抗体反応 (その1) TSA-indirect によるbiotin の増幅

- 100 x avidin-HRP (TSA-indirect Kit 付属)で1hr at R.T 又はO/N at 4 。
- wash
- Amplification diluent (TSA-indirect Kit 付属)50  $\mu$ lに置換 (薄めても良い)。
- 1  $\mu$ l Tyramidyle-biotin を加え、mix。10min 静置。
- wash
- 一部を取って、x 2000-5000 avidin-FITC (かなり薄めのをうけないと真っ黄色に染まって失敗する) を加え、1hr at R.T。
- wash
- シグナルを見て十分であればTSA-indirectによる増幅は一回で良いことになる。もしまだ弱いようであればもう一度、avidin-HRPを反応させるところから行う。うまくいけば2回以上増幅してもほとんどバックが上がらない。必要な増幅回数やTyramidyle-biotinの最適濃度を各自いろいろ試すべきである。
- うまく条件が見つければ、残りのembryoも同様に処理しそのままつぎのステップへ。

#### 7) 抗体反応 (その2) HNPP/Fast Red による発色

- 1000 x anti DIG-AP (Boehringer Mannheim, # 1 093 274) で2hr at R.T又はO/Nat 4 。
- wash
- 発色buffer ( 100mM Tris/HCl pH8.0, 100mM NaCl, 10mM MgCl<sub>2</sub> )に置換。

#### 注意!!

- 普通のアルカリ性発色buffer ( pH9.5 ) を用いてはならない。発色中に形成されたHNP/Fast Redが徐々に流れ出てしまう。
- HNPP Fluorescent Detection Setの取説どおりに発色。はやくて5分後にはサンプルがオレンジがかる。
- たまに検鏡して適当なところで発色をとめる。私は普通1時間は発色させる。
- サンプルはグリセロールに閉じずにPBS+TritonX 0.1%またはTween 0.05%でマウント。HNP/Fast Red はグリセロール中に溶け込む。

#### 8) 蛍光顕微鏡または共焦点顕微鏡で観察

#### 4. むすび

biotin / TSA-indirect のシグナルはAlkaline phosphataseをもちいた柔らかい発色とは全く異なり、ざらついた感じであることは注意しておく必要がある。よって拡大するとあまりきれいに見えない。写真にするときはAlkaline phosphataseの発色とバランスがとれるような倍率で撮るのをすすめる。DIGシステムの場合、Alkaline phosphatase / HNPP発色法を用いなくても、一次抗体反応として1000x anti DIG Mab (Boehringer Mannheim, # 1 333 062)、二次抗体として抗Mouse-Cy3を用いても十分シグナルは見える。TSA-indirectのシグナルの強さとのバランスを考えるとこのほうが良いかもしれない。

もし in situ hybridization法を一度も行ったことがない方は、2、3回 BCIP/NBTを基質をとした発色法で練習を重ねて感じを掴んでから蛍光発色を試すことをお勧めする。またTSA法も使い馴れた一次抗体を希釈し、TSAで増幅して発色させて感じを掴む等の練習を行うことをすすめる。

今回は胚を用いたwhole mount でのin situについて述べたが、原理的にはimaginal discでも同様な事が可能であるはずである。少なくともDIG/HNPP/Fast Red発色はうまくいくようである。ただし、biotin プローブ / TSA増幅法での蛍光in situは筆者は例を知らない。discでうまくいかれた方はこのショウジョウバエ通信で報告をお願いしたい。また蛍光in situ と蛍光抗体反応を組み合わせた染色法およびHNPP/Fast Red発色については、Satoshi Goto and Shigeo Hayashi. (1997). Dev. Genes.Evol 207:194-198 を参考にさせていただきたい。

このプロトコールの作成については国立遺伝学研究所、林 茂生、後藤 聡 両博士、そして田中実穂博士からのアドバイスを大いに参考にさせていただきました。