

FISH 法による遺伝子の可視化

in situ ハイブリダイゼーション (ISH) 法は、染色体上や間期核においてある特定の塩基配列や遺伝子を可視的に位置づける方法として、分子細胞遺伝学の分野では不可欠な技術である。プローブ DNA を標識物質 (ハプテン) で標識し、これとハイブリッドした DNA は、ハプテンに対する蛍光色素標識の抗体を用いて検出することができる (FISH 法; 蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法)。近年、2 種類以上のプローブに対し、異なる標識-検出系を組み合わせることで一度に数種の異なる DNA 配列 (遺伝子) を検出することが可能になり (Lichter et al. 1990)、この方法は多色 FISH 法とよばれ、ヒトの染色体地図作製に大きな成果をあげた (Ried et al. 1992)。ここでは、2 種類の DNA 配列を 2 色で同時検出する方法 (Leitch et al. 1991、Mukai et al. 1993) を紹介する。

1. 染色体標本の作製、変性、脱水

【材料】

植物材料：植物全般

適用範囲：根端分裂組織

【操作手順】

1. 酢酸カーミン溶液を入れた管びんに固定した根端を入れ、そのまま室温で 15 分間ほど軽く染色する。
2. 第 1 章 3 節の【操作手順】8.~18. に従い、押しつぶし法による染色体標本を作製する。
3. 染色かごにプレパラートをセットし、68°C の 2×SSC/70%ホルムアミドへ 2 分間浸す。
4. -20°C のエタノールシリーズへ順に 5 分間ずつ浸していく。
5. プレパラートを染色かごから取り出し、プレパラート立てに並べ、ブローアーを使って表面のアルコールを飛ばし、風乾させる。

注 1)

注 2) プレパラートを保存するときは、シリカゲル入りの暗箱に入れて -20°C にしておく。

注 3) 染色体 DNA が 1 本鎖に変性する。

注 4) DNA のアニーリング(再結合)を防ぎ、脱水を行う。

2. プローブ DNA の標識と変性

【準備】

プローブ DNA (各種プラスミド・BAC クローン DNA、PCR 増幅 DNA、ゲノミック DNA)

DNA 標識キット (ロシュ、Dig-Nick および Bio-Nick Labeling Kit)

ジゴキシゲニン標識ヌクレオチド (ロシュ、Dig-11-dUTP)

ビオチン標識ヌクレオチド (ロシュ、Bio-16-dUTP)

滅菌蒸留水

t RNA/Salmon DNA

4M 酢酸アンモニウム

-20°C エタノール

ホルムアミド (和光純薬)

50% 硫酸デキストラン (シグマ、ろ過滅菌して-20°C 保存)

サケ精子 DNA (シグマ、煮沸処理して-20°C 保存)

20×SSC (3M NaCl、0.3M クエン酸ナトリウム、pH7.0)

氷 (0°C)

【操作手順】

1. 滅菌水でプローブ DNA $1\mu\text{g}/16\mu\text{l}$ にした溶液をマイクロチューブに入れ、これに Dig (または Bio) -Nick キット $4\mu\text{l}$ を加えて混ぜる。
2. 15°C で 90 分間インキュベートする。
3. 65°C、10 分間処理して反応を止める。
4. ボルテックス後、室温に 10 分間置き、エタノール沈殿 (サンプル $20\mu\text{l}$ に対して、t RNA/Salmon DNA $2\mu\text{l}$ 、4M 酢酸アンモニウム $2.5\mu\text{l}$ 、-20°C エタノール $56\mu\text{l}$ を加え、-80°C で 2 時間静置し、10,000rpm で 15 分間遠心する) を行う。
5. 沈殿を乾燥させてホルムアミド $20\mu\text{l}$ に懸濁する。
6. プレパラート 1 枚あたり $10\mu\text{l}$ になるよう、プローブ DNA 混合液 (50% ホルムアミド、20% 硫酸デキストラン、2×SSC、 $5\mu\text{g}$ サケ精子 DNA、滅菌水、 $0.1\mu\text{g}$ 標識プローブ DNA) をマイクロチューブで作製する。
7. プローブ混合液の入ったマイクロチューブを 100°C で 10 分間ボイルする。
8. 直ちにマイクロチューブを 0°C (氷中) に移し、5 分間急冷する。

注釈)

注 5) 100 回程度ピペッティングして、沈殿をホルムアミドに完全に溶かす。保存は -20°C で行う。

注 7) プローブ DNA が 1 本鎖に変性する。

注 8) アニールング (再結合) を防ぐ。

3. 蛍光 in situ ハイブリダイゼーション法

【準備】

定温恒温庫（東京理科器械）

恒温水槽（タイテック）

落射式蛍光顕微鏡（ツァイス、Akioscop）

蛍光フィルターカセット（B2、G、UV励起フィルター）

冷却 CCD カメラユニット（浜松フォトニクス、C4880）

画像解析ソフト（Photoshop ver.5.0 以上）

チャンバーボックス（湿箱）

染色用ガラスびん

染色かご

カバーガラス（マツナミ、18×18mm および 24×32mm）

滅菌蒸留水

20×SSC（3M NaCl、0.3M クエン酸ナトリウム、pH7.0）

TritonX-100

アビジン-FITC（ベクター、1mg/ml）

抗ジゴキシゲニン-ローダミン（ロシュ、滅菌水で 0.1mg/ml に調整）

蛍光染色液（1% BSA / 4×SSC、1% アビジン-フルオレセイン、1% 抗ジゴキシゲニン-ローダミン）用事調整

マウント液（DABCO; 抗退色剤、2ng/μl DAPI; 4',6-Diamino-2-phenylindole、シグマ）用事調整

【操作手順】

1. 変性後の染色体標本 1 枚あたり、10 μl のプローブ DNA 混合液（変性済み）をかける。
2. カバーガラス（18×18mm）をかけ、精製水で湿らせたろ紙を敷いたチャンバーボックスの中にプレパラートを並べる。
3. 37℃ の定温恒温庫に入れて 16 時間静置し、ハイブリダイゼーション反応をさせる。
4. 2×SSC 中でプレパラートにのっているカバーガラスをはがす。
5. 室温の 2×SSC に 5 分間浸し、プレパラートを洗浄する。
6. 40℃ の 2×SSC / 50% ホルムアミドに 15 分間浸す。
7. 室温の 2×SSC で 15 分間、室温の 1×SSC で 15 分間それぞれ洗浄する。
8. 室温の 4×SSC に 5 分間浸す。
9. 蛍光染色液（1% BSA / 4×SSC、1% アビジン-fluorescein、1% 抗ジゴキシゲニン-ローダミン）をプレパラート 1 枚あたり 65 μl ずつ滴下し、37℃ で 30 分間インキュベートする。
10. それぞれ室温の 4×SSC、0.1% TritonX-100 / 4×SSC、4×SSC で各 10 分間ずつ、プレパラートを洗浄する。
11. 室温の 2×SSC に 5 分間プレパラートを浸す。

12. 軽く水気をきって、プレパラートあたり 20 μ l のマウント液をのせ、カバーガラス (24 \times 36mm) をかける。
13. 蛍光顕微鏡を用いて蛍光シグナルを観察する。フルオレセインは B2 励起フィルターを用いて緑色で観察でき、ローダミンは G 励起フィルターによって赤色に、DAPI は UV 励起フィルターで青色に見られる。
14. 冷却 CCD カメラで 3 種類のフィルターそれぞれの観察画像を取り込む。得られた画像はすべて白黒のため、画像解析ソフト (Photoshop) を用いて FITC、Cy3、DAPI の検出画像へ緑、赤、青の擬似カラーをほどこし、合成カラー画像を作製する。

注釈)

注 2) カバーガラスは、アルコールに浸漬保存している清浄なものを用いる。プレパラートが直接ろ紙に触れないよう、ガラス棒などの上にのせる。

注 5、7) 染色かごととプレパラートを軽くゆすって洗う。

注 10) 遮光し、染色かごととプレパラートを軽くゆすって洗う。

注 11) 遮光する。

注 12) 染色体が DAPI によって青色蛍光色に対比染色される。

