

● ターゲットプローブ混合液の調製

オリゴメーカー等により合成された
1本鎖オリゴ DNA

36 塩基の P1 プローブ
39 塩基の P2 プローブを
それぞれ別々に等量ずつ混合

P1 プローブ混合液

P2 プローブ混合液

TE を足して
各オリゴ DNA 濃度を
1 ~ 10 μ M に調整
↓
冷凍保存

● 染色プロトコル ~ Day 1

準備・前処理

(1 ~ 14: 詳細プロトコル参照番号)

0 Hybridization buffer
室温に戻しておく

1 サンプルスライド
× 1 回以上
PBS 5 分間

2 × 1 回
メタノール 10 分間

3 × 2 回
PBST 5 分間

プレハイブリ

4 Hybridization buffer
3 秒間 × 3 回
完全に混合

4 サンプルスライド
キムワイプ等で試料以外の
部分の液体を拭き取る

Hybridization buffer
を滴下

パラフィルムを
かぶせる

*: アプライ量は
適宜調整下さい
100 μ L*

ハイブリダイゼーション

4 湿潤箱に入れて
室温 5 分間静置

5 Hybridization buffer
プローブ混合液
遺伝子 A P1, P2
遺伝子 B P1, P2
遺伝子 C P1, P2
プローブ Hybridization 液の調製

* 各オリゴ DNA
終濃度: 20nM

95°C 3 分間

室温静置

6 キムワイプ等で試料以外の
部分の液体を拭き取る

プローブ Hybridization
液を滴下

パラフィルムを
かぶせる

*: アプライ量は
適宜調整下さい
100 μ L*

6 湿潤箱に入れて
37°C で overnight

● 染色プロトコル ~ Day 2

ヘアピン DNA の熱処理

(1 ~ 14: 詳細プロトコル参照番号)

7

必要量の Short hairpin amplifier を PCR tube に別々に分注する

サーマルサイクラーで熱処理→冷却を行う

熱処理・冷却を行っている間に以下 8 ~ 9 を済ませておく

8

Amplification buffer

室温に戻しておく

完全に混合

3秒間 × 3回

スライドの洗浄

9

サンプルスライド

0.5 × SSC

37°C 10分間 × 3回

11

冷却が終了した Short hairpin amplifier

Amplification buffer

※ 別々のチップで加える

各ヘアピン DNA 終濃度 60nM + 核染色試薬 (Hoechst 等)

HCR 反応液の調製

3秒間 × 3回

完全に混合

HCR

12

サンプルスライド

キムワイブ等で試料以外の部分の液体をしっかりと拭き取る

パップペンで組織の周囲に撥水ラインを引く

HCR 反応液を滴下

スライドを数回傾けて反応液を行き渡らせる

100µL*

*: アプライ量は適宜調整下さい

12

湿潤箱に入れて 25°Cまたは室温で 2時間

スライドの洗浄

13

PBST

× 3回 → × 1回

37°C 10分間

PBS 室温 5分間以上

14

退色防止封入剤

封入