

はじめに

ISHpalette™ short hairpin amplifier は組織切片上の生体分子を検出する従来の *in situ* HCR 法を改良し開発された蛍光ヘアピン DNA 試薬です。

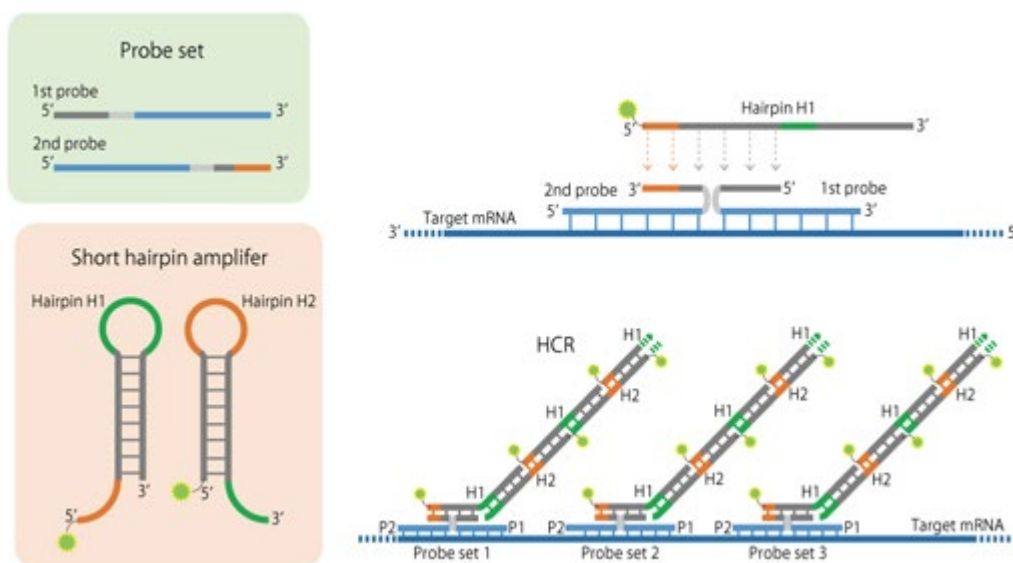
In situ HCR とは 2004 年に Dirks と Pierce が発表した Hybridization chain reaction (HCR) 法というヘアピン構造を持った核酸の自己触媒的な増幅反応¹⁾を利用して、組織切片上で HCR を起こし、蛍光標識した DNA もしくは RNA を標的核酸に重合させる *in situ* Hybridization 法²⁾であり、抗体反応や酵素反応を用いないためシグナル強度には直線性があり、高いシグナルノイズ比を持っています。

ヘアピン DNA の HCR (重合反応) を開始させる配列を持った 2 つのプロブのハイブリダイゼーション・その後の HCR によって蛍光標識された DNA が標的 mRNA に特異的に結合します。HCR は 2 つのプロブが正確な位置にハイブリダイゼーションしないと起こらないため、非特異的な反応が最小限に抑えられているという特徴があります。

本製品はヘアピン DNA をさらに短鎖化し、これまでの浸透処理は不要になりました 3)。さらに 1 分子当たりのハイブリダイゼーションにかかる時間が減少するため、反応が早くプラトーに達し、シグナル強度も上昇するのが特長です。

この手法は培養細胞を含む様々な組織に適用可能で、**パラフィン切片・凍結切片・浮遊切片・浮遊細胞・ホルマウント**全てに適用可能です。Protease K などの浸透処理を行う必要なく非常にマイルドな条件 (最大 37°C) で染色を行うことが出来るため、免疫染色との併用や、内在性の GFP などの**蛍光タンパクを保持したまま可視化することも可能**です。プロブ濃度を標準プロトコルの 20 倍まで濃くしてもノイズは増えないほど特異性が高く、ステップ数が少ないこともあり**高い再現性・定量性**があるのも特徴です。

- 1) Dirks and Pierce 2004 PNAS
- 2) Choi et al. 2010 Nat Biotech; 2014 ACS nano; 2018 Development
- 3) Tsuneoka and Funato 2020 Front. Mol. Neurosci.



ISHpalette™ Short hairpin amplifier 概要

適用

生物組織の固定標本における mRNA の検出

構成

カテゴリ	品名	包装	品番
ヘアピンDNA	ISHpalette® Short hairpin amplifier, SaraFluor™488-S23	for 25 slides (50 μL each)	IPL-G-S23
	ISHpalette® Short hairpin amplifier, SaraFluor™488-S45		IPL-G-S45
	ISHpalette® Short hairpin amplifier, ATTO550-S41		IPL-R-S41
	ISHpalette® Short hairpin amplifier, ATTO550-S73		IPL-R-S73
	ISHpalette® Short hairpin amplifier, ATTO647N-S72		IPL-B-S72
	ISHpalette® Short hairpin amplifier, ATTO647N-A161		IPL-B-A161

保管条件

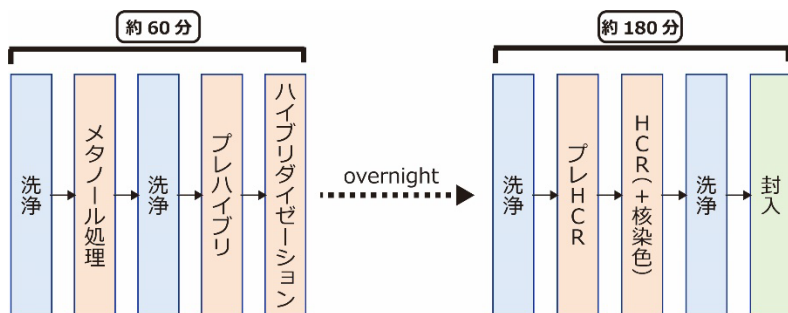
遮光し冷蔵庫(4-8°C)で保管して下さい。冷凍保存を行ったり、少ない液量で長期間保存すると蛍光ヘアピン DNA が凝集する場合があります。ヘアピン DNA は特殊なバッファーに溶解しておりますので、保管時に溶液は希釈しないでください。

品質保証

- ・使用期限内にご使用下さい。(現在、プレ販売品のため未設定)
- ・不適切な保管をされた場合、製品の品質および性能は保証されません。

※本製品は研究用です。臨床用途には使用できません。

フローチャート



凍結切片の染色工程(簡易例)

1. 透過処理 メタノールで室温 10分
2. 洗淨 PBST で室温 5分×2回
3. プレハイブリダイゼーション ターゲットプローブ抜き Hybridization バッファーで常温～37°C 5-10分
4. ハイブリダイゼーション ターゲットプローブ入りの Hybridization バッファー 37°C一晩
5. 洗淨 0.5×SSCT で37°C 3回×10分
6. プレ増感 室温 Amplification バッファー 室温 or 25°C 5分以上
7. 増感と検出(+核染色) Amplification バッファー+ ISHpalette® Short hairpin amplifier H1 および H2 (+核染色) 室温 or 25°C 2時間
8. 洗淨 PBST で37°C 10分×3回
9. 封入

染色プロトコル

実験を始める前に下記のマニュアルすべてに目を通してください。

準備するもの

- ・メタノール
- ・リン酸緩衝液(PBS)
- ・Tween-20 入りリン酸緩衝液(PBST)
- ・Hybridization バッファー(作製についてはレシピ参照)
- ・Amplification バッファー(作製についてはレシピ参照)

※溶液に使用する水は基本的には RNase フリーであることが望ましいですが、決して必須ではありません。実験中はコンタミに気を付けるよりも、迅速にハイブリダイゼーションまで終わらせること、常温以上の温度で長時間置かないことが RNA の分解には最も効果的です。

準備する機器

- ・マイクロピペッター

- ・ 37°Cのインキュベーター
- ・ 25°Cに冷蔵可能なインキュベーター(用意が可能であれば)

※温度設定を 25 にできても、冷蔵機能がついていない場合には実際には 25 度になりません (冷蔵機能の無いインキュベーターでは室温より 5 度以上高い気温が下限となっています)

- ・ サーマルサイクラー
- ・ ピンセット
- ・ パラフィルム
- ・ 染色バット
- ・ スライドガラス反応用の湿潤箱
- ・ カバーガラス
- ・ 共焦点レーザー顕微鏡または蛍光顕微鏡

※1 コピーレベルのシグナルを検出したい場合は共焦点レーザーが必要

凍結組織切片の染色の手順

～始める前のポイント～

・ 1 から 5 までのステップに時間をかけずに迅速に行うことできれいに染まりやすくなります。あらかじめ Hybridization バッファーを室温に戻し、プローブ入りの Hybridization バッファーの調整をしておく方が良いです。

・ Hybridization バッファーや Amplification バッファーは粘性が高いです。全ての試薬はタッチミキサーで十分攪拌してから使用してください(3秒 x3回)。また、スライドガラス全体に均一にいきわたるように滴下するだけでなくスライドガラス等を傾けて何度も繰り返しスライドガラス上で混ぜることをお勧めします。

1. 凍結組織切片を乗せたスライドを用意し、未使用の PBS に室温で 5 分浸しコンパウンドを落とす。
note: 従来の in situ Hybridization 法とは違うため、Proteinase K 処理や DNase 処理は行う必要はありません。メタノール保存をしている場合はメタノールによる透過処理は不要です。
2. メタノールにスライドを室温で 10 分浸し細胞膜の脱脂および透過処理を行う。
3. 未使用の PBST にスライドを室温で 5 分間浸し、洗浄する。洗浄操作をもう一回繰り返す。
4. 室温に戻した Hybridization バッファーを切片一つ一つ覆うように 100 μ l ずつ各スライドの上に乗せ、空気が入らないようにピンセットを用いて、切片にパラフィルム(2.5 \times 3.0 cm くらい)を注意深くかぶせる。組織が乾かないよう湿潤箱に入れて室温で 5 分置く。
5. スライドを軽くたたいて余分な液体を除く。ターゲットプローブを混ぜた Hybridization バッファーを切片一つ一つ覆うように 100 μ l ずつスライドの上に乗せ、空気が入らないようにピンセットを用いて、切片にパラフィルム(2.5 \times 3.0 cm)を注意深くかぶせる。組織が乾かないよう湿潤箱に入れて 37°Cで一晩置く。

note: 翌日に洗浄で 37°Cの 0.5xSSCT を使用するのと一緒にインキュベーター内に入れておく方が良い。

※ターゲットプローブは 5'側と 3'側の 2 種類を混ぜて 1 μ M に希釈したものを Hybridization バッフ

ァー100μl に対し 2μl 入れる。(Final 20nM)

※複数遺伝子の染色を行う場合は使用するターゲットプローブすべてを1つのHybridizationバッファァーに同じように混ぜてください。例えばA遺伝子とB遺伝子の検出の場合、Hybridizationバッファァー100μl に対しA遺伝子プローブを2μl、B遺伝子プローブを2μl 入れてください。

6. 37°Cの0.5xSSCTにスライドを37°Cで10分間浸し、洗浄する。洗浄操作をもう二回繰り返す。
7. パップペンで組織の周りを囲い、室温に戻したAmplificationバッファァーをスライドの上に乗せ、組織が乾かないよう湿潤箱に入れて室温または25°Cで5分置く。
8. ISHpalette®Short hairpin amplifierのH1とH2を必要量だけ**混ぜずに別々のPCR tube**に分注し、サーマルサイクラーで95°C 2分の後-2°C/分で65°Cまで冷やし、その後-1°C/分で25°Cまで冷やす。(もし2μl必要な場合は加熱による揮発を考慮し3μl入れる)
 ※多色の染色を行う場合は使用するShort hairpin amplifierすべてを同じように行ってください。
9. スライド1枚あたりAmplificationバッファァー100μlにISHpalette®Short hairpin amplifier H1とH2をそれぞれ2μlずつ混ぜ、vortex 3秒x3回
 ※核染色が必要な場合は一緒に混ぜる(Hoechstの場合Final 1μg/mlになるように)
 ※多色の染色を行う場合は各色のhairpin amplifier H1とH2すべてを1つのAmplificationバッファァーに同じように混ぜてください。
10. 混ぜてから可能な限り早く切片に滴下する。
 note: 高濃度のヘアピンDNA同士が接触するとノイズの原因になるので、混ぜるときもチップは交換する
11. 組織が乾かないよう湿潤箱に入れて25°Cまたは室温で2時間置く。(ヘアピンDNAを混ぜ始めてから2時間とする)
12. PBSTにスライドを37°Cで10分浸し、洗浄する。洗浄操作をもう一回繰り返す。
13. PBSにスライドを室温で5分浸し、洗浄する。
14. 蛍光退色防止の封入剤で封入。
15. 封入後、観察および撮影をするまで4°Cで保存。(封入剤にもよるが1週間くらいは観察可能)

免疫染色と併用時の手順について

ISHpalette™ Short hairpin amplifier の手順に従って染色を行う。



13の洗浄の後、ブロッキングから免疫染色を行ってください。

パラフィン切片の手順について

1の部分の前処理で脱パラフィン・脱キシレン・浸水処理を行いPBSに浸す。その後、2の工程より染色を行ってください。賦活化処理や高熱処理は不要です。

ホールマウントの手順について

1の部分の前処理で75% MetOH/PBST 5分→50% MetOH/PBST 5分→25% MetOH/PBST 5分を行い、3の工程より染色を行ってください。

ハイブリダイゼーションおよび増感の反応は96wellプレートに1wellあたり1個体を入れ、100μlの液で反応させると少量の試薬で実験が可能になります。

核染色は9の工程で同時に行うと深部まで浸透しやすくなります。

13の工程まで終了したらSeeDBで透明化し観察してください。(ScaleやCubicなどの透明化試薬が入っていることが多い尿素がHCR産物との相性が悪くシグナルが消失するので、そのような試薬を使う場合には染色後に固定処理などを行えば可能かもしれません。HCR産物が分解する可能性は考慮してください。)

※SeeDB法に関する詳しい情報については、今井 猛博士らによるウェブサイト SeeDB Resources (<https://sites.google.com/site/seedbresources/>) を参照ください。

切片の観察のポイント

- ・1コピーのmRNAが非常に小さな1個の顆粒状のシグナルとして検出されます。(発現量が多いと分かりづらいです)
- ・1コピーレベルで検出をするためには共焦点顕微鏡を使用してください。
- ・1コピーを検出するためにはNA0.7以上のレンズで長めの露光時間(1波長当たり6 us/pixel以上推奨ですが、高解像度で見える場合にはより遅いスピードでイメージングしてください)、強いレーザーで検出することから始めてください。アベレーシングはあまり影響ありませんので最低限の回数で構いません。
- ・洗いが不十分だと全体的に顆粒状のバックが出ることがあります。その場合は封入前の洗浄を長めにしてみてください。
- ・ネガコンまたは未染色切片で自家蛍光が強すぎないことを必ず確認してください。
- ・自家蛍光が強い場合には油浸レンズを使う、切片の厚みを薄くするなどの対処で解決する場合があります。
- ・上記を考慮した上でもシグナルが見えない場合、可能性としては低いですがプローブの標識配列が適切でない場合もあります。mRNAに対するプローブ結合領域を増やすもしくは変更してみてください。

※弊社ではターゲットプローブの受託設計も行っています。

- ・本プロトコルは製品の改良や仕様変更および改善のため、予告なく変更することがあります。
- ・本製品は他社製品の性能または使用につきましては対応しておりません。
- ・本開発製品は東邦大学 医学部 解剖学講座微細形態学分野 准教授 恒岡洋右先生が開発された技術(特許出願中:特願 2020-102748)を用いて、東邦大学と共同で開発・製品化を行っております。