

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標識ヘアピン 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) 法というメソッドで、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 反応を起こし、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⁾です。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。

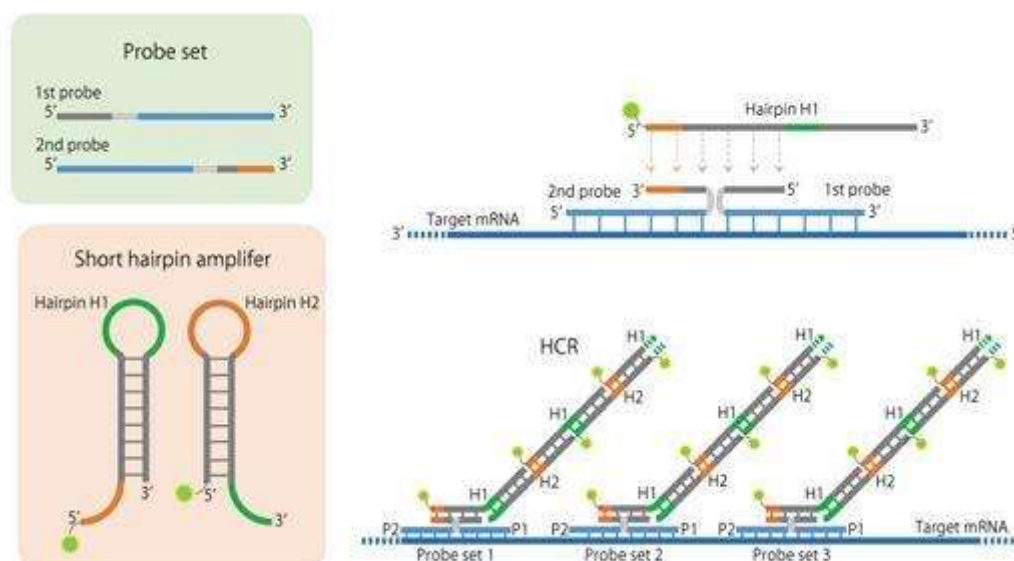
本製品はヘアピン DNA をさらに短鎖化し、これまでの浸透処理は不要になりました³⁾。さらに 1 分子当たりのハイブリダイゼーションにかかる時間が減少するため、反応が早くプラトーに達し、シグナル強度も上昇するのが特長です。

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・接着細胞・浮遊細胞・ホルマウント**全てに適用可能です。Proteinase 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**蛍光タンパク質によるシグナルを保持したまま目的遺伝子の発現を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 μ L 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, Cyanine5-S72		IPL-B-C-S72
	ISHpalette® Short hairpin amplifier, Cyanine5-A161		IPL-B-C-A161

保管条件

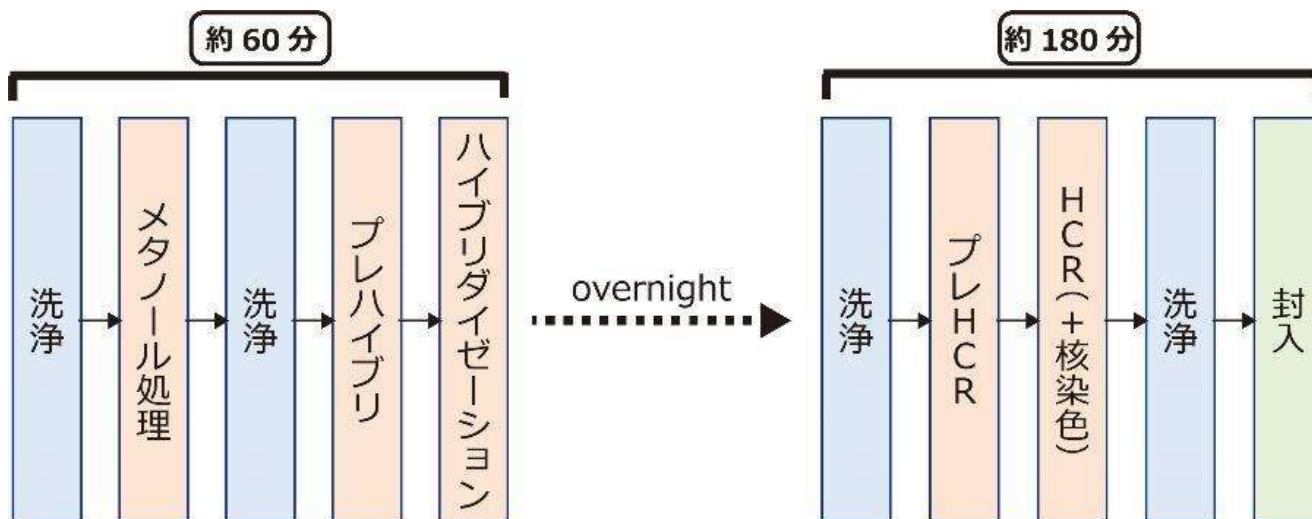
遮光し冷蔵庫(4-8°C)で保管して下さい。冷凍保存を行ったり、少ない液量で長期間保存するとヘアピン DNA が凝集する場合があります。ヘアピン DNA は特殊なバッファーに溶解しておりますので、保管時に溶液は希釈しないでください。

品質保証

- ・ 使用期限内にご使用下さい。
- ・ 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)

※染色工程の詳細は次ページ以降に記載してあります。染色前に必ず目を通してください。

【1日目】

1. 透過化処理 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の Hybridization バッファーで常温～37℃ 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℃一晩

【2日目】

5. ISHpalette® Short hairpin amplifier H1 および H2 の熱処理
6. 洗淨 0.5×SSCT で 37℃ 3 回×10 分
7. プレ増感 Amplification バッファー 室温 or 25℃ 5 分以上
8. 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℃ 2 時間
9. 洗淨 PBST で 37℃ 10 分×3 回、PBS で 5 分×1 回
10. 封入

染色プロトコル

試薬

- ・ ISHpalette® Short hairpin amplifier H1 (冷蔵保存)
- ・ ISHpalette® Short hairpin amplifier H2 (冷蔵保存)
- ・ Hybridization Buffer (-20~-30°C 保存、使用前に室温に戻す)
- ・ Amplification Buffer (冷蔵保存、使用前に室温に戻す)
- ・ DNA プローブ混合液 (-20~-30°C 保存) (※次ページ参照)
- ・ メタノール特級
- ・ PBS
- ・ PBST (PBS, 0.1% Tween20)
- ・ 0.5×SSCT (0.5×SSC, 0.1% Tween20)
- ・ 蛍光染色用封入剤 (推奨: ISHpalette™ Mounting Medium)

※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

一般的な分子生物学実験・組織学実験に用いる機器があれば実験可能です。ピペットチップや染色バットなどは滅菌処理もしくは RNA グレードのものを使用することを推奨します。

- ・ マイクロピペッター
- ・ 37°C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°Cにできても、冷却機能が搭載されていない場合には実際には 25°Cになりません。

(冷却機能の無いインキュベーターは室温+5 度が設定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
- ・ 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顕微鏡が必要です。

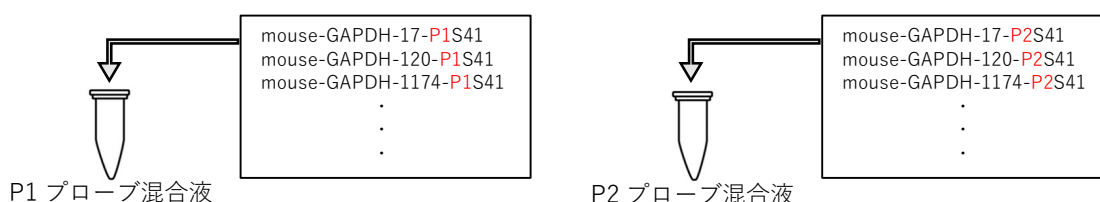
サンプルの調製

通常のパラフィン切片、凍結切片、浮遊切片、接着細胞・浮遊細胞、組織ブロックの染色が可能です。RNA の分解を防ぐため、4%PFA による灌流固定もしくは 10%中性緩衝ホルマリン溶液による浸漬固定を 4℃で 1 晩以上行ってください。また、作製した切片等は-20℃以下で保存してください。

ターゲットプローブ混合液の調製

※弊社ではターゲットプローブの受託設計も承っております。お気軽にご相談ください。

- オリゴメーカー等により合成された 1 本鎖オリゴ DNA について、36 塩基の P1 (5'側) プローブおよび 39 塩基の P2 (3'側) プローブを、それぞれ別々に等量ずつ混合する。



- P1 プローブ混合液および P2 プローブ混合液それぞれに TE を加えて、各オリゴ DNA の最終濃度を 1~10μM に調整する。

例：8 種類の P1・P2 が各 50μM で 100μL ずつ納品された場合、

各 P1 オリゴ DNA を 90μL ずつ 8 種類混合 + TE を 180μL 添加 → 5μM P1 プローブ混合液

各 P2 オリゴ DNA を 90μL ずつ 8 種類混合 + TE を 180μL 添加 → 5μM P2 プローブ混合液

- 使用まで凍結 (-20~-30℃) 保存する。凍結融解を繰り返しても通常は問題ありません。

凍結組織切片の染色手順

～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 バッファーの調製をしておくといいです。
- ・ Hybridization バッファーおよび Amplification バッファーは完全に室温に戻してから使用して下さい。粘性が高いため、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×3 回)。また各試薬は滴下するだけでなく、サンプル全体に均一にいきわたるようにスライドガラス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。
- ・ 従来の *in situ* Hybridization 法とは異なり、Proteinase K 処理やアセチル化、DNase 処理は行う必要はありません。場合によってはシグナルが低下することがあります。

- 【1 日目】

1. 切片の準備

凍結組織切片を乗せたスライドを用意し、PBS に室温で 5 分間浸しコンパウンド等を除去する。

2. 脱脂および透過処理：メタノール 室温 10 分

メタノールにスライドを室温で 10 分間浸し細胞膜の脱脂および透過処理を行う。

3. 洗浄：PBST 室温 5 分×2 回

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. プレハイブリダイゼーション：Hybridization バッファー 室温 5 分

室温に戻した Hybridization バッファーを切片一つ一つ覆うように 100μL ずつスライドに滴下し、切片をカバーできるサイズのパラフィルムを、ピンセットを用いて空気が入らないように注意深くかぶせる。組織が乾かないよう湿潤箱に入れて室温で 5 分間静置する。

5. ターゲットプローブ入り Hybridization 液の準備（事前に調製も可）

Hybridization バッファーは使用前に融解し、十分に攪拌しておく。

プローブ混合液 1μM を Hybridization バッファー 100μL に対し 2μL 加える (Final 約 20nM)。調製したプローブ Hybridization 液は 95°C 3 分間の熱変性を行い、十分に攪拌した後に使用まで室温で静置しておく。

※複数遺伝子の染色を行う場合はすべてのターゲットプローブを同一の Hybridization バッファーに同じように混合してください。

- 2枚のスライドガラスで遺伝子 A のみを SF488-S23 を用いて検出する場合

	1枚当たりの液量	最終濃度	合計 (× 2)
Hybridization バッファー	100 μ L		200 μ L
遺伝子 A-S23 P1 プローブ混合液 1 μ M	2 μ L	(約 20 nM)	4 μ L
遺伝子 A-S23 P2 プローブ混合液 1 μ M	2 μ L	(約 20 nM)	4 μ L
プローブ入り Hybridization 液	104 μ L		208 μ L

- 2枚のスライドガラスで遺伝子 A を SF488-S23 で、遺伝子 B を AT550-S41 で検出する場合

	1枚当たりの液量	最終濃度	合計 (× 2)
Hybridization バッファー	100 μ L		200 μ L
遺伝子 A-S23 P1 プローブ混合液 1 μ M	2 μ L	(約 20 nM)	4 μ L
遺伝子 A-S23 P2 プローブ混合液 1 μ M	2 μ L	(約 20 nM)	4 μ L
遺伝子 B-S41 P1 プローブ混合液 1 μ M	2 μ L	(約 20 nM)	4 μ L
遺伝子 B-S41 P2 プローブ混合液 1 μ M	2 μ L	(約 20 nM)	4 μ L
プローブ入り Hybridization 液	108 μ L		216 μ L

6. Hybridization 37°C overnight

スライドから余分な液体を可能な限り除く（キムワイプなどを用いて切片が乗っていない場所の液体は完全に取り除く）。プローブ Hybridization 液を切片一つ一つ覆うように 100 μ L ずつスライドに滴下し、切片をカバーできるサイズのパラフィルムを、ピンセットを用いて空気が入らないように注意深くかぶせる。組織が乾かないよう湿潤箱に入れて 37°Cで一晩静置する。

パラフィルムがスライドガラスからはみ出していると Hybridization 中に溶液が流れ出してしまうおそれがあります。パラフィルムはスライドからはみ出さないサイズに調整してください。

翌日スライドの洗浄に使用する 0.5×SSCT を一緒に 37°Cインキュベーター内に入れて保温しておくと、スムーズに染色が行えます。

2 日目に続く。

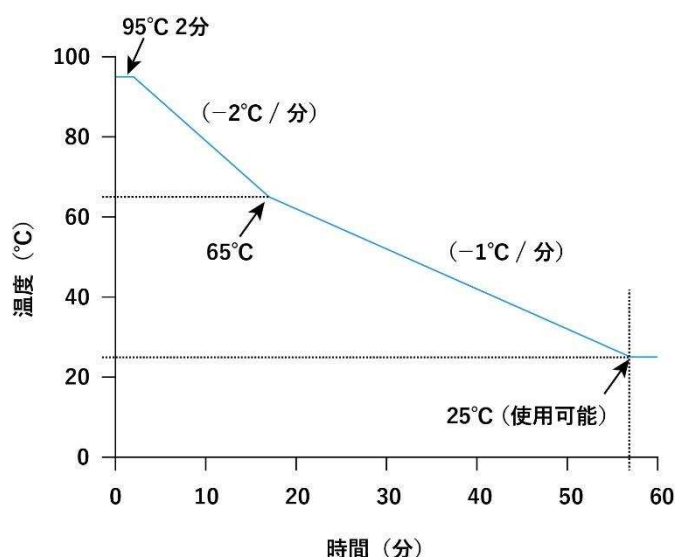
● 【2 日目】

7. ヘアピン DNA の熱処理：サーマルサイクラーにて約 1 時間

染色に必要な ISHpalette® Short hairpin amplifier の量を計算する。

(この時、2 μ L 必要な場合は加熱による揮発を考慮し 3 μ L を熱処理する)

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、1 分あたり 2°C ずつ冷やしていき 15 分かけて 65°C まで冷やし、その後 1 分あたり 1°C ずつ冷やしていき 40 分かけて 25°C まで冷やす。**熱処理は時間がかかるので、熱処理を行っている間に下記の 8, 9, 10 の作業を行っておく。**



サーマルサイクラーにスロープ機能がない場合、1 サイクルごとに温度を下げていくタッチダウン PCR 機能を代替として使用可能です。

プログラム例：

①	95.0°C	02:00	× 1 cycle
②	94.5°C	-0.5°C/cycle	00:15 × 59 cycles
③	65.0°C	-0.5°C/cycle	00:30 × 80 cycles
④	25.0°C		∞

8. Amplification バッファの準備

Amplification バッファを冷蔵庫から出し、室温で静置する (30 分以上)。この間、以降の 9, 10 の作業を行っておく。

※室温によってはバッファが濁って見えることがありますが、バッファのミセル化によるもので問題はありません。また室温に戻ったバッファは分離していることがありますので、室温で 30 分以上経ったら十分に攪拌しておいてください。

9. 洗浄 : 0.5×SSCT 37°C 10 分×3 回

パラフィルムをピンセットで注意深く剥がし、予め温めておいた 37°C の 0.5×SSCT にスライドを浸し、37°C で 10 分間洗浄する。洗浄操作をもう 2 回繰り返す。

10. プレ HCR : Amplification バッファー 25°C 5 分以上

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 分間静置する。

11. HCR 反応液の作成

Amplification バッファー 100 µL に ISHpalette® Short hairpin amplifier H1 および H2 を、スライド 1 枚あたりそれぞれ 2 µL ずつ加え、vortex を 3 秒 × 3 回かけてよく混合する。

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してください。また核染色が必要な場合は一緒に混合してください(Hoechst の場合 Final 1 µg/mL)。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 バッファーに同じように混合してください(下記参照)。

- 2 枚のスライドガラスで遺伝子 A のみを SF488-S23 を用いて検出する場合

	1 枚当たりの液量	合計 (× 2)
Amplification バッファー	100 µL	200 µL
SF488-S23 H1	2 µL	4 µL
SF488-S23 H2	2 µL	4 µL
発色溶液	104 µL	208 µL

- 2 枚のスライドガラスで遺伝子 A を SF488-S23 で、遺伝子 B を AT550-S41 で検出し、同時に核染色も行う場合

	1 枚当たりの液量	合計 (× 2)
Amplification バッファー	100 µL	200 µL
SF488-S23 H1	2 µL	4 µL
SF488-S23 H2	2 µL	4 µL
AT550-S41 H1	2 µL	4 µL
AT550-S41 H2	2 µL	4 µL
Hoechst (100 µg/mL)	1 µL	2 µL
発色溶液	109 µL	218 µL

12. 増感（HCR）：Short hairpin amplifier 入り Amplification バッファ 25℃ 2 時間以内

スライドから余分な液体を可能な限り除く（キムワイプなどを用いて切片が乗っていない部分の溶液を完全に取り除く）。手順 11 で作成した反応液を混ぜてから可能な限り早く切片に滴下する。滴下したら、**スライドガラスを繰り返し傾けてスライドガラス上で反応液をよく混合する**。組織が乾かないよう湿潤箱に入れて 25℃または室温で 2 時間静置する。

反応時間は手順 11 でヘアピン DNA を混ぜ始めてから 2 時間以内としてください。反応液が薄まらず、十分量ある状態を維持することが実験の成功の秘訣です。**30 分に 1 回以上スライドガラスを傾けてスライドガラス上で反応液をよく混ぜるとムラの無い染色が成功しやすいです。**

13. 洗浄：PBST 37℃ 10 分×3 回、PBS 室温 5 分間以上

PBST にスライドを浸し、37℃で 10 分間洗浄する。洗浄操作を 2 回繰り返す。
PBS にスライドを浸し、室温で 5 分間洗浄する。

14. 封入

蛍光退色防止の封入剤で封入し、観察および撮影をするまで 4℃で保存する（封入剤にもよりますが 1 週間くらいは問題なく観察可能です）。

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います。



手順 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

サンプルを脱パラフィン・脱キシレン・浸水処理を行い PBS で洗浄後、手順 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。

ホルマウントの手順について

サンプルを 75% MetOH/PBST 5 分→50% MetOH/PBST 5 分→25% MetOH/PBST 5 分浸漬して再水和したのちに、手順 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 サンプルを入れ、100μL 程度の溶液で反応させると少量の液量で染色が可能です。

核染色は手順 9 で同時に行うと深部まで浸透しやすくなります。

手順 13 まで終了したら SeeDB で透明化し観察してください。（Scale や Cubic などの透明化試薬に含まれている尿素は HCR 産物の解離を促しシグナルが消失します。尿素が含まれた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が、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/>) をご参照ください。

切片観察のポイント

- ・ 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行うためには共焦点顕微鏡を使用してください。
- ・ 1 コピーの mRNA 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。
- ・ 洗浄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。
- ・ ネガティブコントロール実験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。

- ・ 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(特許第 7482506 号)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。