

通常のIn situ ハイブリダイゼーション法

0. 組織固定のプロセス

1. 組織切片を60°Cで加熱し、パラフィンを溶解する
2. 脱パラフィン操作(キシレン10分×3回)
3. エタノール再水和系列(100%EtOH×3回→90%EtOH→80%EtOH→70%EtOH→50%EtOH)
4. PBS洗浄
5. 1 μ g/ml proteinase K処理(37°C、15分)
6. PBS洗浄×2回
7. アセチレーション操作(0.25%無水酢酸加0.1M TEA)、15分間浸し洗浄する
8. 0.1M TEA、15分間洗浄する
9. 4×SSC、10分間洗浄する
10. 4×SSC、5分間洗浄する
11. Pre-hybridization緩衝液(50% Formamide, 2×SSC)で37°C、30分間反応する
12. Hybridization緩衝液(2×SSC, 1% SDS, 1mg/ml BSA, (10% Dextran), 1mg/ml salmon sperm DNA, 1mg/ml tRNA, 50% Formamide)にDigoxigenin標識cRNAプローブを最終濃度1 μ g/mlで加え、37°C、一晩、ハイブリダイゼーションを行う
13. Pre-hybridization緩衝液で37°C、20分間浸し洗浄する
14. 0.2×SSC中で37°C、20分間浸し洗浄する
15. 0.1×SSCにて42°C、20分間、3回浸し洗浄する
16. NT緩衝液(150mM NaCl, 100mM Tris-HCl pH7.5)に、5分間浸し洗浄する
17. ブロッキング試薬(1mg/ml Blocking reagent(Roche), 10% FBS, 1mg/ml tRNA)で30分間ブロッキングする
18. アルカリホスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体Anti-digoxigenine-AP, Fab fragments (Roche)を滴下し60分間インキュベート
19. NT緩衝液に、10分間、2回浸し洗浄する
20. NTM緩衝液(100mM NaCl, 100mM Tris-HCl pH9.5, 50mM MgCl₂)に5分間浸す
21. アルカリホスファターゼの発色基質として、NBT/BCIP Stock Solution (Roche)で発色を行う
22. 顕微鏡下で観察しながら、適当な時点で、発色を停止させる
23. 反応停止後のサンプルスライドは水洗する
24. [核染色] メチルグリーン染色
25. 水溶性封入剤を滴下しカバーグラスをかぶせる
26. 鏡検してシグナルを確認し、室温で保存する