

In situ hybridization to polytene chromosomes of *Drosophila*

from E. Wimmer, 杉山改変 950404

これはできる限り簡略化したプロトコールですが、きれいな標本ができます。飼育の部分が最も重要で、大きな染色体をもつ大きな幼虫を育てることが肝心です。

Culture (すべて18℃で飼育。)

Dry yeastを振った牛乳びんで1日採卵

2-3日して幼虫が肉眼で見えるようになったら、小葉匙で1掻き(50-100匹)すくって新しい牛乳瓶に移す。その牛乳瓶にはあらかじめ中葉匙の小さい匙一杯のglucoseを入れてエサをこねておき、その上に中葉匙の大きい匙一杯のdry yeastを振る。2-3日したらdry yeastを少し振り、エサをまぜかえす。

幼虫が瓶の壁を登り始めた日にその瓶を使う。瓶のなかの湿度が高い場合は壁に登った幼虫でも使えるが、乾燥している場合はエサの上を這っている幼虫を使う。

Squashes

大きく、太っていて、動きがまだいい幼虫を選び、PBSでエサなどを洗いおとす。

気管がすでに反転したものは不可。

ペーパータオルでPBSを吸い取り、シリコン処理したスライドグラス上の数滴分の40%酢酸中で解剖する。鈍った5型ピンセットで胴体をおさえ、研いだ5型ピンセット(チタン製がいい)で黒色の頭部内骨格を押さえるようにして引っ張る。

唾腺は大きく、葡萄のふさのように細胞の輪郭が丸く膨らんだものが多い。唾腺がつるつるのものや細胞の核が白くはっきり見えるものは遅すぎる。脂肪体をできるだけ除き、唾腺の先端1/3を切りとる。

シリコン処理し、キムワイプで磨いた18×18mmのカバーグラス上の1滴の40%酢酸に唾腺の先端部を移し、10分固定する。1つのカバーグラスに3対の唾腺。EtOHで綺麗に磨いたスライドグラスをカバーにのせて唾腺をつぶす。このとき、カバーグラスがスライドの先端近くにくるようにすると後の溶液の量が少なくすむ。

カバーを下にしてペーパータオルに載せ、一度強く押して、余分な固定液を吸い取る。唾腺の遺伝型をスライドの曇り部分に鉛筆で書く。

カバーを上にして、4枚重ねのペーパータオルの上に置き、カバーの端を指で強く押さえ、づれないようにしながら、鉛筆の裏の消しゴムでカバーを軽くたたく。中心部から渦巻き状に外側へ約1分たたく。

またカバーを下にしてペーパータオルに載せ、強く押して、余分な固定液を吸い取る。対物×10の位相差で観察する。もし細胞の形が残っているようだったらたたき足りない。もし溶液が流れていたら、たたきと押しが足りないか、気管等のつぶれない構造やゴミが挟まれているからである。もし染色体が広がっていなかったら、スライドの縁でテーブルに強くたたくことにより、カバーをわずかにづらす。または鉛筆の先端でカバー上を数回スキャンするようになぞる。

液体窒素で急冷凍

剃刀でカバーをすばやくはがし、凍っているあいだにエタノール酢酸（3：1）に10分入れる。

エタノールに10分入れる。

空气中で乾燥させる。この状態で数カ月以上保存できる。この段階で顕微鏡で観察し、良い標本を選択する。対物×10で点線状のバンドまでみえるはず。

Pretreatment（変性処理）

1)

2×SSCの入った染色瓶を流水waterbathにつけ、瓶の中に温度計をたてて68にする。（waterbathを70に設定するとちょうど良い。）

標本をこれに30分間つけて変性させる。

冷たい（室温可）2×SSCの入った染色瓶に標本を移し、2分間つける。

（以後、乾燥まで1つの染色瓶で液交換）

70%EtOH 5分間 ×2回

95%EtOH 5分間 ×1回

空气中で乾燥させる。

2)

新しく用意した0.07 N NaOH (pH 12.5) に室温で3分間つけて

さらに変性させる。（10M NaOH 350ul + 水50 ml）

（以後、乾燥まで1つの染色瓶で液交換）

2×SSC 5分間 ×3回

70%EtOH 5分間 ×2回

95%EtOH 5分間 ×1回

空气中で乾燥させる。

染色体の欠落がないことを顕微鏡下で確認する。

Hybridization（プローブはあらかじめ用意すること）

プローブを10分間煮沸し、液体窒素で急冷する。

標本に変性したプローブ30ulのせ、2.2×2.2mmのカバーグラスをする。

それを、水を底にひたしたチップラック（yellow tip用）にいれて、気温53（設定55）のオープンにいれ、12-16時間ハイブリさせる。

（以下、1つの染色瓶で液交換）

53の2×SSC 15分間 ×2回

PBT 5分間 ×3回

Detection

anti-DIG抗体 0.5 ulをPBT 100ulで希釈し（1/200）標本にのせ、2.4×4.5mmのカバーグラスをかぶせ、水を底にひたしたチップラック中で1時間反応させる。

（以下、1つの染色瓶で液交換）

P B T 3分間 × 3回

AP buffer 3分間 × 3回

4.5ul NBT, 3.5 ul X phosphateをAP buffer 200ulで希釈し標本にのせ、24 × 45 mmのカバーグラスをかぶせ、水を底にひたしたチップラック中で反応させる。発色を時々顕微鏡下で確認する。15分から24時間と様々。標本によって、それぞれ違うので1つ1つ確認すること。光に反応するのでできるだけ暗くしておく。NBTは発ガン性なので手袋を使用すること。

水 3分間 × 3回

新しく用意したGiemsa で2分間染色 (Giemsa 原液5 ml + P B S 45 ml)

流れるイオン交換水で2分間脱洗

濡れたまま顕微鏡で染色を確認し、必要ならさらにGiemsa で染色。

標本によって、それぞれ違うので1つ1つ確認すること。

空気中で乾燥

先端を切ったyellow tipでDiatex (Permoundなどの)封入材を30ulのせ、24 × 45 mmのカバーグラスをかぶせ、重石をする。

Observation

通常の光学系で観察、シグナルが見つからない場合は位相差光学系でみるとわかりやすい。油浸は封入材が充分固まるまで(1日?)使わない。

DIG Probeの作成 (5-6時間かかる)

エッペン・チューブに9 ul H₂O + 200 ng insert DNA。

クリップ・ロックして10分煮沸。

液体窒素で急冷、軽くspin down。

氷上で次のものをたす。

2.0 ul 10x LB (以下参照)

6.0ul 10 mg/ml hexamer soln. (Pharmacia #27-2166-01)

2.0ul labelling mix (DIG+dNTPs) Boehringer Genius kit より
一度 mixする

1.0ul 5 unit/ul Klenow (酵素、すぐ失活する)
またmixする

15 で1時間 (Waterbathにfloat) ここでprimer annealing

室温で3時間 (O.N.も可)

EtOH 沈殿 (取り込まれなかったDIGラベルを除く、省略可。)

3 ul 1 M NaCl

60 ul Cold EtOH

0.5 ul 20 mg/ml tRNA

mix well,

-70 30分、

14,000 rpm 4 20分

丁寧に上清を除く

150 ul 70% EtOH

mix

14,000 rpm 4 5分

丁寧に上清を除く

Speedvac 5分

200 ul hybridization soln.

使用直前にクリップ・ロックして10分煮沸して変性させる。忘れるな！

液体窒素で急冷、軽く spin down、mixして30 ul 使用。

Media

10x LB

(store -20)

475 ul 1M Pipes pH 6.6

25 ul 1M MgCL₂

3.3 ul beta mercaptoethanol

PBS

pH 6.9 に調整

140 mM NaCL

7mM Na₂HPO₄

3mM KH₂PO₄

PBT

PBS+0.1% Tween 20

AP buffer

100mM Tris pH 9.5

100mM NaCL

50mM MgCl₂

add 0.1% Tween 20 before use

Hybridization soln.

(store -20)

50% formamide

5x SSC

50ul/ml heparin

0.1% Tween 20

add 100ug/ml denatured fish sperm DNA before use

20x SSC (1000ml)

175.3 g NaCl

88.2g Na-citrate 2H₂O