

***in situ* hybridization to salivary gland chromosome using Dig labeled probe**

(by 松林宏 3/4/1997)

スライド作製

- 1、十分栄養をとらせた3令幼虫を育てる。(a)
- 2、45%酢酸中で解剖し唾腺を取り出し1 2 3 溶液を1滴弱たらしたシリコナイズしたカバーガラスの中に移す。(b,c)
- 3、約5-10分放置後、スライドガラスをカバーガラス(18mmX18mm)の上から近づけカバーガラスを張り付ける(唾腺が中央にくるように注意する)。(d)
- 4、スライドをひっくり返し、表にする。唾腺のある上から柄付きバリを、軽く押し当ててカバーガラスを上下左右にずらす。この操作を針の位置を少しずつ換えながら10数秒行う。この操作により細胞、核を壊し染色体を広げることが出来る。(e)
- 5、ペーパータオルを3つ折りにした間にプレパラートをカバーガラスを下にして挟みペーパータオルの上からちょうど唾腺の上に親指を当て上から全体重をかけ押しつぶす。この時はカバーガラスはずれないようにする。
- 6、位相差顕微鏡で検鏡する。(f)
- 7、冷蔵庫に一晩保存する(省略可能)。液体窒素にゆっくりスライドをつけ数秒そのまま保持し沸騰が収まったらすばやく取り出し剃刀の刃をカバーガラスの隅に当ていっきにカバーガラスをはがす。
- 8、95%エタノールに入れ五分以上放置後、取り出し風乾する。再度位相差顕微鏡で検鏡する。光らずにバンドがふつうに見えるスライドを選定する。冷蔵庫で保存可能。(g,h,i,j)

(注意)

- (a) 18度で飼育する必要はないが酵母を途中で与えるなど栄養をよくすることがよいスライドを作る上で強いては、*in situ*を成功させる上で最も重要である。
- (b) 生理食塩水中で解剖してもいいが、より鮮明なバンドを示すプレパラートを作るには45%酢酸中で解剖した方がいい。また出来るだけ唾腺のみを取るべきではあるが多少の脂肪体の混入はかまわない。
- (c) カバーガラスのシリコナイズ
希釈したシリコナイズ液に数秒カバーガラスを浸した後水道水でよく流し蒸留水で洗った後、風乾する。一度に大量に処理しておくとも便利。使う直前でよくキムワイプで拭きほこり、ゴミ等を除く。希釈したシリコナイズ液は密閉して保存しておき何度でも使える。
- (d) プレクリーンのスライドガラスを使う。特に前処理は必要ない。カバーガラスと同様使う直前によくキムワイプで拭きほこり、ゴミ等を除く。カバーガラスとスライドガラスの間のゴミはよいスライドを作る上で大敵である。スライドの一番はしに張り付けると、後に使う溶液も少なくすすみかつ唾腺のある位置も一定させることが出来て都合がいい。
- (e) この操作はよいスライドを作る上で重要である。このとき堅いゴミ等があるとカバーガラスがなめらかにずらすことが出来ずよいスライドを作ることはおぼつかない。慣れないうちは位相差顕微鏡下でときどき観察しながら行うといい。
- (f) 腕が十分に伸びかつスライドによく張り付いているのがいい。染色体がコントラストよくバンド等くっきり見えるのは逆に染色体がスライドによく張り付いていないためである。このときは再度押しつぶすといい。
- (g) エタノールは未変性の缶入りエタノールでいい。
- (h) 染色体が光ってしまうのは押しつぶしが十分でなく染色体がスライドガラスによく張り付いていないためである。

- (i) 95%エタノールを-20℃に冷やしておくで染色体の形状維持にいいという報告もあるが、私がやった限りさほど変化なかった。
- (j) 冷蔵庫で1-2週間保存可能であるが、すぐ次の操作を行ったほうがよりよい結果をもたらす。もし保存したいときは、つぎの2XSSCの処理が終わってからのほうがより望ましい。

スライド前処理

- 1、65度にあらかじめ暖めておいた2XSSCにつけ30分処理する（以下、染色瓶を使う）。
- 2、70%エタノール5分間処理を2回を行う。
- 3、95%エタノール5分間処理後風乾（このステップで冷蔵庫で保存可能）。
- 4、0.07N NaOHに2分間つけ変性する（時間厳守、変性後はハイブリ、検出を連続して行う）。
- 5、2、3、同様70%エタノール5分間2回、95%エタノール5分間1回処理し風乾（エタノールは何回か使える）。

Hybridizationと検出（ハイブリダイゼーション以降は検出後までスライドを乾かさな

- 1、タッパウエア等に染色体面を上にしてスライドを並べ10ml程度（スライド一面液で覆われること）のハイブリ液をかけ密閉し60度で一晩（16時間以上）hybridizationを行う（ハイブリ溶液はハイブリ後回収し再利用可能）。
- 2、55度の2XSSC, 0.1% SDSで15分間2回洗浄（以下、染色瓶またはタッパウエア）。
- 3、Buffer2で室温30分処理（ブロッキング）。
- 4、Buffer2で1000倍希釈したAnti-digoxigenin-AP conjugate（ベーリンガー社）100-200 μ lをスライドの染色体上に載せる（染色体がのっている部分以外の水分をよく拭う）。水平にして絶えず染色体が溶液に覆われていることを確認して室温で30分処理する。
- 5、Buffer1で15分2回室温で洗浄。
- 6、Buffer3で5分間処理。
- 7、4と同様染色体部分以外の水分をよく拭い、染色液30-50 μ lをのせカバーガラス（22mm X 22mm）をかけ湿箱に入れ暗いところに置き室温で染色。1-2時間後に位相差顕微鏡で検鏡。十分染色されていたら蒸留水でよくすすぎ風乾する。この状態で少なくとも数カ月は保存可能。検鏡するときは蒸留水を載せカバーガラスをかけ位相差顕微鏡で検鏡、および写真撮影。もし染色が十分でないときは軽くBuffer3で洗浄した後、新たな染色液を載せさらに染色を続ける（～一晩）。

溶液

123溶液：乳酸、水、酢酸を1：2：3の容量比で混ぜたもの（長期間保存可能）

20XSSC：3M NaCl, 0.3M NaCitrate (pH7.0)

ハイブリダイゼーション溶液：5XSSC, 1% Blocking Reagent（ベーリンガー社、恐らくカゼインで代用可能）、0.1% サルコシル、0.02% SDS、20ng/ml程度のDigoxigenin probe DNA（サザンロット等フィルターハイブリダイゼーションに使うものとプローブ濃度等全く同じもの、また少なくとも数回は再利用可能, 7%SDS入りのChurchのbuffer系は不可）

Digoxigenin labeled DNA：ランダムプライム等でベーリンガーのマニュアルどうりラベルする。

Buffer1：100mM Tris-HCl, 150mM NaCl (pH7.5)

Buffer2：1% Blocking Reagent（ベーリンガー社、他社製カゼインで代用可能）in Buffer1（65度で溶かす）

Buffer3：100mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 50mM MgCl₂ (pH9.5)

染色液：20 μ l NBT/BCIP Stock solution（ベーリンガー社）in 1 ml Buffer3