

FISH

遺伝子改変マウスのGFP遺伝子の
染色体上の位置の可視化と
ヒト染色体特異的DNAプローブによるFISHの検出

○○○ 実習内容 ○○○

- * GFP遺伝子の蛍光標識プローブを作製し、
蛍光イメージアナライザーで確認する。
- * 培養細胞から染色体標本を作製する。
- * ヒト染色体特異的DNAプローブでFISHを行い、
共焦点レーザ顕微鏡で観察する。

藤島高等学校 富永組
下村 齊藤 酒井



【1】FISH法の原理

- FISH法は細胞や組織に存在するRNAやDNAの特異的な塩基配列を蛍光で検出することである。

【2】標識プローブの作製

- ターゲット遺伝子のcDNAを作製し、それを500塩基に切断し、蛍光色素を標識するためにラベルされたヌクレオチドを挿入する方法としてニックトランスレーション法が用いられる。

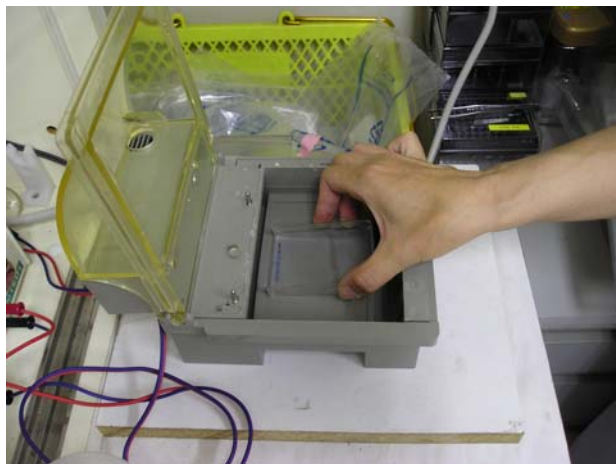
ニックトランスレーション法

- ① 2本鎖のDNAをDNase Iで不特定に切る
- ② DNAポリメラーゼIの5' - 3' エキソヌクレアーゼ活性により切り、5' - 3' ポリメラーゼ活性により修復合成を行う
- ③ 熱変性によりDNA2本鎖から1本鎖にする
- ④ 蛍光色素が標識されたものを加える
→ DNAの塊を目で確認できる

標識プローブの確認

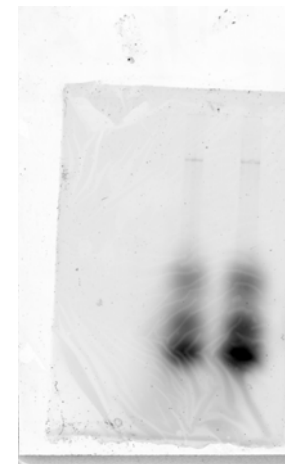
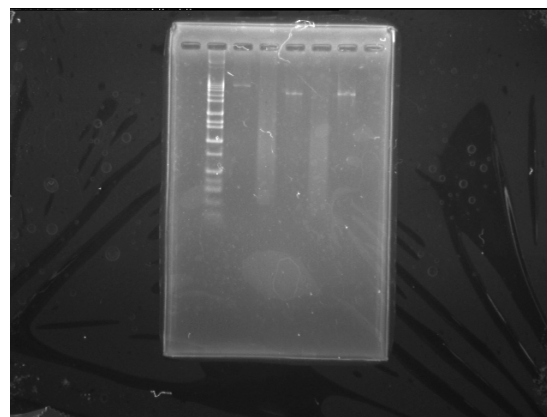
• ゲルの電気泳動

分子量の小さな分子ほどゲルの網目状構造の中を早く移動し、大きい分子は遅く移動するため大きさによって分離することができる



• ゲルの蛍光観察

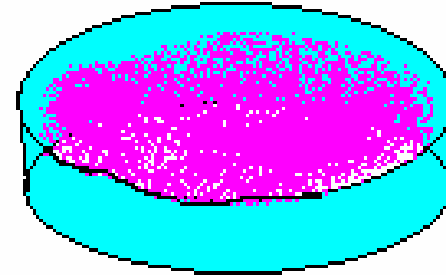
電気泳動が終了したゲルはエチジウムブロマ이드で染色しUVを照射するとDNAやRNAなどの核酸が蛍光を発して可視化できる



【3】 染色体標本の作製法

*** 使用する細胞 ***

- ・ ヒト株化培養細胞（正常）
- ・ HL60（急性骨髄性白血病細胞）



まずは**細胞の準備**から！！

- (1) 培養液を継代後、CO2インキュベーターで1～2日間培養する。

* 培養期間は、長すぎず、短すぎず！！

- (2) 濃度が $0.025 \mu\text{m/ml}$ になるようにコルセミド溶液を加える。

- (3) 再び1.5～2時間培養する。

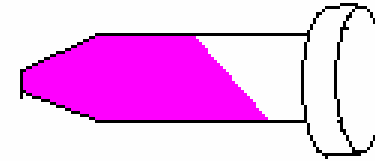
* 培養時間が短いと染色体は長いが分裂指数が低く、
長いと染色体は短いが分裂指数は高くなる。



次は**固定**する！！

- (1) 培養液を滅菌遠心チューブに移し、遠心。
[1.500rpm 3分間]
- (2) 上清を取り除き、低張液を**10ml**になるように加える。
→細胞が浮遊する！
- (3) カルノア液を**1ml**重層し、静かに混和し、遠心。
↓
パスツールピペットで、下の層からとって
上に重層するのを繰り返す。
* 急に混和しない！！
→細胞が壊れちゃうから！
- (4) 上清を**3ml**残して捨て、沈殿をピペッティングで懸濁し、
カルノア液を**3ml**重層し、静かに混和。
- (5) 十分に混和したら、カルノア液を、さらに**6ml**重層し、
静かに混和し、遠心。 [1.500rpm 3分間]
- (6) 上清を**3ml**残して捨て、沈殿をピペッティングで懸濁し、
カルノア液を**10ml**重層し、静かに混和し、遠心。
- (7) 上清を捨て、カルノア液を**10ml**を加え、混和し、遠心。
[1.500rpm 3分間]

滅菌遠心チューブ↓



- (8) もう一度上清を捨て、カルノア液を**10ml**加え、
混和し、遠心。 [1.500rpm 3分間]
- (9) 上清を捨て、適当な細胞密度になるように
カルノア液を加える。
- (10) スライドグラスに1滴落として検鏡し、
濃度の調節をする。

同じ作業が多かったけど、最後の顕微鏡のトキの感動を味わいたいがため、真剣にやった。
そして、この作業のおかげで、ピペット使いがうまくなったと思う(^^)v
あと、遠心は低温が良いと学んだので、後日行われたテストで正解することができた！！笑

そして、スライドグラスへ展開 だぁ～！！

まずは準備をする。

- ・ スライドグラスを冷カルノア溶液に浸けて冷やしておく。
- ・ ウォーターバスを67℃に温めておく。

(1) 冷たいスライドグラスの5～10cm上から、
固定した細胞をパスツールピペットを使って1～2滴落とす。

- * 距離、滴数は、染色体の開き具合、細胞密度、
細胞膜の状態などによって、調整する！！
とりあえず、1枚は試しにやってみる。
・・・ちなみに私は、6枚もやりました(^_^;)

(2) 滴下したところに息を吹きかけて均一に広げ、
余分なカルノア溶液をキムワイプで吸い取る。

(3) すぐに、ウォーターバスの蒸気の上にスライドグラスを載せる。

(4) スライドグラス上に水滴が所々残るくらいまで
2～3分乾燥させる。

- * 水面からスライドグラスまでの距離でも染色体の
開き具合が変わるので注意！

(5) ドライヤーの冷風で風乾させる。

(6) 染色体の開き具合、細胞密度などを
顕微鏡で確認する。

対物レンズ10×の視野に、細胞膜を
かぶっていない染色体が1～2個あると
良い！！



あったらそのスライドグラスを採用！
細胞が、ごちゃごちゃしてるのは、観察時に
バックグラウンドが高くなるので、やめた方がい
いよ。



【4】 キットを使用した ヒト染色体特異的DNAプローブFISH法

*** 使用したプローブ ***

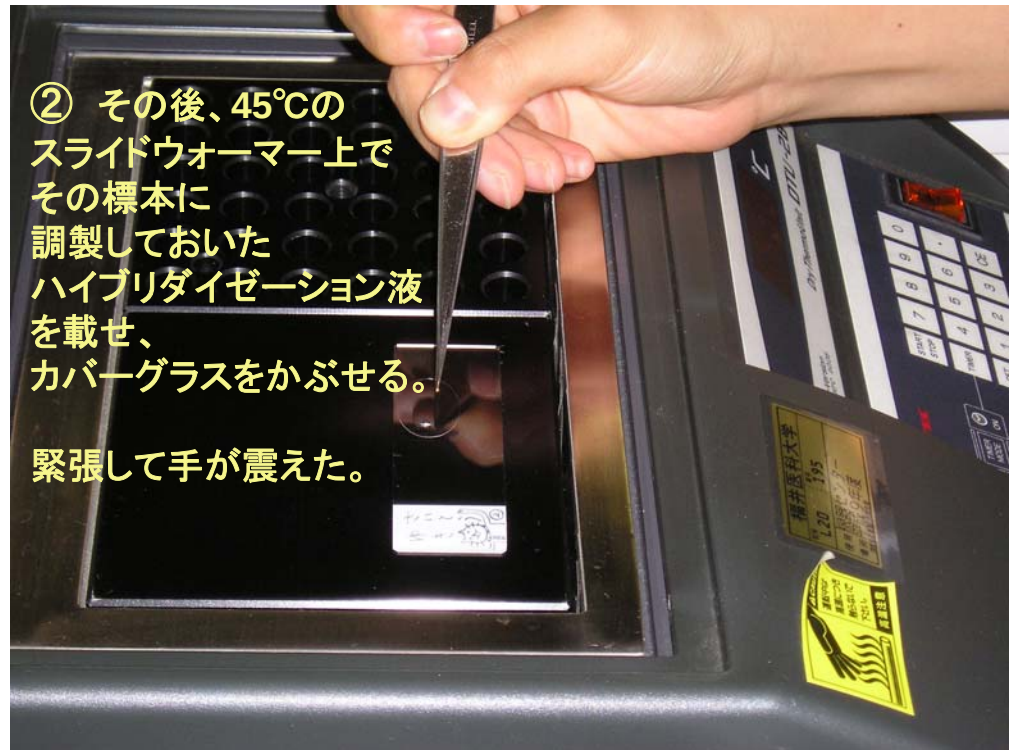
- ・ヒト9番染色体特異的プローブ
→ オレンジ～赤色の蛍光
- ・ヒト13番染色体特異的プローブ
→ 緑色の蛍光
- ・ヒトX, Y染色体テロメア特異的プローブ
→ 黄色～オレンジの蛍光



- ① 【3】で作製した染色体標本をエージングし、
エタノール洗浄液で脱水・洗浄したあと、
DNAの変性を行う。

- ② その後、45℃の
スライドウォーマー上で
その標本に
調製しておいた
ハイブリダイゼーション液
を載せ、
カバーガラスをかぶせる。

緊張して手が震えた。



- ④ 湿潤箱に入れ、37℃で一晩ハイブリダイズする。



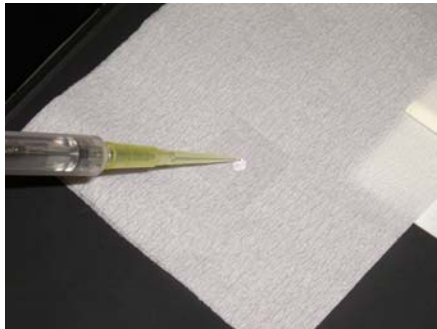
⑤ なるべく遮光して洗淨。

← ペーパーボンドを取り除く
ぺろっとキレイにめくれる。

そして、45℃のウォーターバスにつけてあった50%ホルムアミドや、
2×SSCで洗淨していく →



⑥ 対比染色 * * * * *

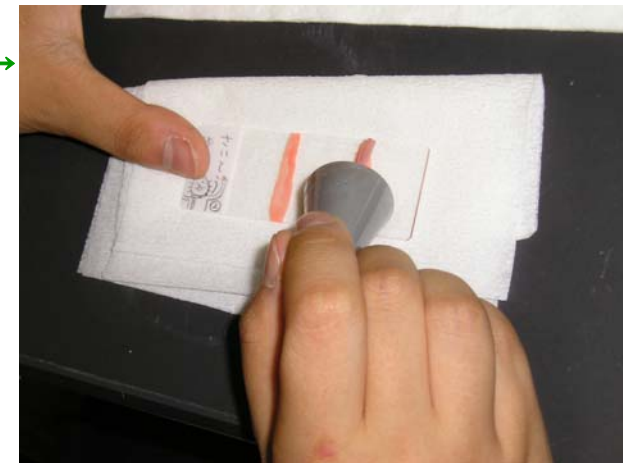


カバーガラスの上にDAPI対比染色液を滴下し、
その上にスライドグラスを載せる。(通常は逆)
この方法だと気泡が入りにくいというメリットがある。



これもドキドキする作業

染色液が自然に広まった後、→
カバーガラスの周りを
マニキュアでシールする。
完全に乾いたら、
共焦点レーザ顕微鏡で観察!!!

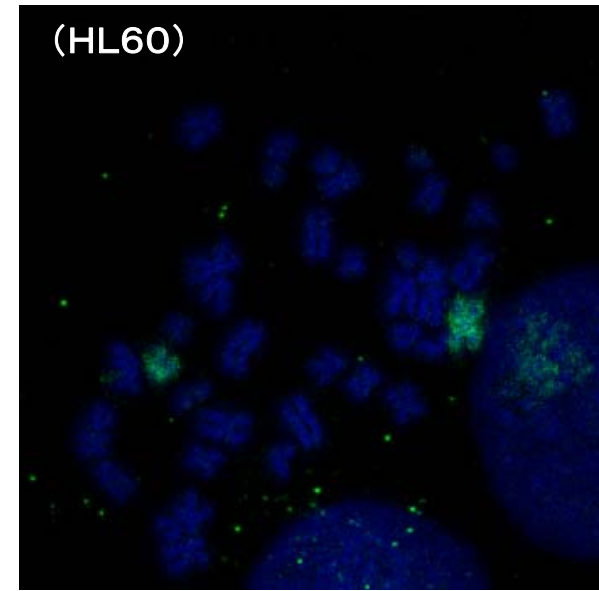
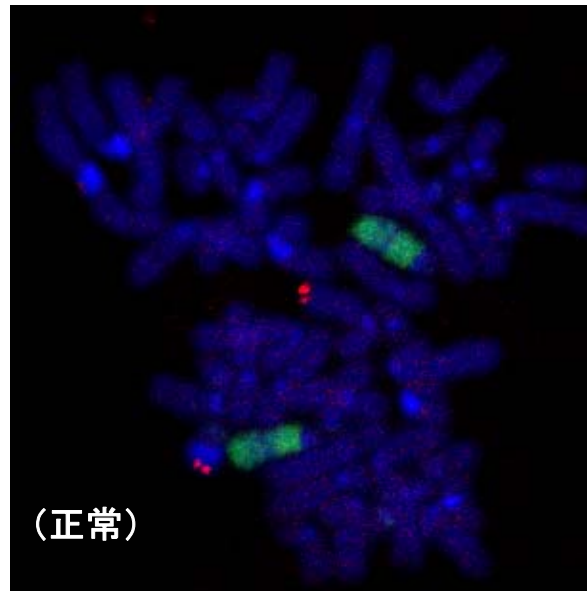


【5】 蛍光観察

共焦点レーザー顕微鏡とは、光源にレーザーを用いたもので目で直接見れないため、画像処理をする必要がある。高速レボルバを上下させることによりクリアな3次元像を構築することができる。



実際にレーザー顕微鏡をつかって自分たちが染色した細胞を見た。ハイブリや染色が成功していたので安心した。あと、染色体が本当にXの形をしていてとても単純なことだが驚いた。



正常な細胞とHL60(急性骨髄性白血病細胞)の13番染色体を染色したものの染色体の大きさに異常があることがわかる
赤く染色してあるものはテロメア