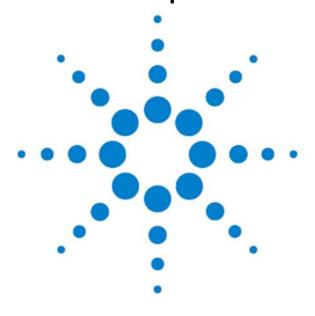
# アジレント FISH General Purpose Reagents プロトコル

FISH Hybridization Buffer
FISH FFPE Hybridization Buffer
IQFISH Fast Hybridization Buffer
FISH Wash Buffer 1
FISH Wash Buffer 2
FISH Mounting Buffer
FISH Mounting Buffer with DAPI
ISH Pepsin Kit



Protocol Version F0, September 2015 対応 (日本語版 2015 年 10 月作成) Research Use Only

プロトコルは予告なく変更になることがあります。プロトコルを日本語化するにあたり、作業時間が発生するため、日本語 プロトコルは英語の最新バージョンに比べて、どうしても遅れが生じますことご了承ください。

# 目次

本プロトコルでは Agilent FISH General Purpose Reagents を用いて、染色体展開標本もしくはホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)により保存されていた組織で、fluorescence in situ hybridization (FISH) を実施する方法を記載しています。

- 始める前に (FISH 実験開始時の重要な情報)
   このチャプターでは FISH 実験を始める前の重要な情報を記載しています。
- 非 FFPE 試料の FISH 操作手順 (オーバーナイトハイブリダイゼーション)
   このチャプターでは、非 FFPE 試料をオーバーナイトのハイブリダイゼーションで FISH
   実験を行う操作手順を記載しています。
- 3. 非 FFPE 試料の FISH 操作手順 (IQFISH Fast Hybtidization Buffer を用いた方法) このチャプターでは、非 FFPE 試料を 90 分のハイブリダイゼーションで FISH 実験を行う操作手順を記載しています。
- FFPE 試料の FISH 操作手順
   このチャプターでは、FFPE 試料で FISH 実験を行う操作手順を記載しています。

なお、ハイブリダイゼーションの試薬として IQFISH Fast Hybridization Buffer のご使用をお 勧めいたします。

1.	. 始める前に (FISH 実験開始時の重要な情報)	4
	FISH 概要	4
	FISH General Purpose Reagents の保存条件	4
	FISH general purpose reagents の型式一覧	5
2.	非 FFPE 試料の FISH 操作手順 (オーバーナイトハイブリダイゼーション)	7
	必要な試薬と機器	7
	操作手順	8
	1. プローブハイブリダイゼーションミックスの調製	8
	2.プローブと染色体 DNA の変性・ハイブリダイゼーション	9
	2 -A. プローブと染色体 DNA を一緒に変性する方法	10
	2 -B. プローブと染色体 DNA を別々に変性する方法	
	3 . スライドの洗浄	14
	4. スライドの観察	15
3.	3. 非 FFPE 試料の FISH 操作手順 (IQFISH Fast Hybtidization Buffer を用いた方法)( <mark>推</mark> 野	
	必要な試薬と機器	
	操作手順	
	1. スライドの調製	
	2. スライドの前処理	
	3. プローブハイブリダイゼーションミックスの調製	
	4.DNA 変性および FISH プローブのハイブリダイゼーション	
	5. スライドの洗浄	
	6. 脱水	
	7. 標本作成と顕微鏡による観察	
4.	. FFPE 試料の FISH 操作手順	
	必要な試薬と機器	
	操作手順	
	1. 前準備	
	2. 試料の脱パラフィンと親水化	
	3. 温浴槽による事前の加熱処理	
	4. ペプシンによるタンパク質分解	
	5. 脱水	
	6.DNA 変性および FISH プローブのハイブリダイゼーション	
	5-A. IQFISH Fast Hybridization Buffer による方法( <mark>推奨</mark> )	
	5-B. FISH FFPE Hybridization Buffer による方法	
	6. スライドの洗浄	
	7.脱水	
	8. 標本作成と顕微鏡による観察	37

## 1. 始める前に (FISH 実験開始時の重要な情報)

#### FISH 概要

アジレントの FISH General Purpose Reagents は fluorescence *in situ* hybridization (FISH) プロトコルで使用するようデザインされております。

「2. 非 FFPE 試料の FISH 操作手順 (オーバーナイトハイブリダイゼーション)」と「3. 非 FFPE 試料の FISH 操作手順 (IQFISH Fast Hybtidization Buffer を用いた方法)」に記載されているプロトコルでは、出発材料はスライドに固定された間期(interpahse)もしくは 分裂中期(metaphase)の染色体展開標本です。FISH 法にあった手順で染色体標本スライドを作製してください。作製した染色体標本スライドは、使用するまで−20℃で保存してください。

出発材料がホルマリン固定パラフィン包埋組織試料である場合は、「4. FFPE 試料の FISH 操作手順」に記載されているプロトコルをお使いください。このプロトコルでは、必要なヒストロジー用試薬に加えて、Agilent IQFISH Fast Hybridization Buffer (Agilent p/nG9415A か G9416A) または Agilent SureFISH FFPE Hybridization Buffer (Agilent p/nG9410A) を使用します。

## FISH General Purpose Reagents の保存条件

#### -20℃で保存

- FISH Hybridization Buffer
- FISH FFPE Hybridization Buffer
- IQFISH Fast Hybridization Buffer
- FISH Mounting Buffers (with DAPI)
- FISH Mounting Buffers (without DAPI)

#### 室温で保存

- FISH Wash Buffer 1
- FISH Wash Buffer 2

# FISH general purpose reagents の型式一覧

本 FISH プロトコルに記載されている Agilent・DAKO 製品の型式は以下のとおりです。

#### ■ 非FFPE試料

## (ハイブリダイゼーション時間:一晩)プロトコル p.7~

※Metaphase FISH以外は標本とプローブを別々に変性することを推奨 (またはIQFISH Fast Hybridization Bufferを使用するプロトコルp.18~を推奨)

品名	販売メーカ	品番	備考
FISH Hybridization Buffer (non-FFPE only)	Agilent	G9400A	1 vial, 100μL/vial
FISH Wash Buffer 1	Agilent	G9401A	1 bottle, 500mL/bottle
FISH Wash Buffer 2	Agilent	G9402A	1 bottle, 500 mL/bottle
FISH Mounting Buffer			1 vial, 100μL/vial
with DAPI	Agilent	G9404A	
without DAPI	Agilent	G9403A	

#### セット品

品名	販売メーカ	品番	備考
FISH Hybridization Buffer and Mounting	Agilent	G9405A	各1 vial, 100µL/vial
Buffer with DAPI, 各100µL	Agricit	GJTOJA	H 1 Viαi, 100μL/ Viαi
FISH Hybridization Buffer and Mounting	Agilent	G9406A	各1 vial, 300µL/vial
Buffer with DAPI, 各300µL	Agrient	GJHUUA	HI Viai, 300µL/Viai
FISH Hybridization Buffer and Mounting	Agilent	G9407A	各1 vial, 100µL/vial
Buffer without DAPI, 各100µL	Agrient	G9407A	HI Viai, 100µL/Viai
FISH Hybridization Buffer and Mounting	Agilent	G9408A	各1 vial, 300µL/vial
Buffer without DAPI, 各300µL	Agrient	GJTUOA	i Ητ viai, συσμέ/viai

## (ハイブリダイゼーション:90分) プロトコル p.16~

品名	販売メーカ	品番	備考
Agilent IQFISH Fast Hybridization Buffer	Agilent	G9415A	1 vial, 200μL/vial
Dako Cytology FISH Accesory Kit	Dako	K5477	
· Dako Wash Buffer (x20)			
· Dako Stringent Wash Buffer (x20)			
· Dako Coverslip sealant			
· Dako Fluorescence Mounting Medium			
FISH Mounting Buffer with DAPI*	Agilent	G9404A	1 vial, 100µL/vial

<sup>\*</sup> DAPI/FITC/Cy3 triple filterを使用している場合にのみお使いください。

但し、シングル・ダブルフィルタのご使用をお勧めいたします。(シグナル強度や光安定性が良くなります)

#### ■ FFPE試料 (プロトコル p.25~)

#### (ハイブリダイゼーション時間:14-20時間)

品名	販売メーカ	品番	備考
Dako Histlogy Accesory Kit	Agilent, Dako	K5799	
· Dako Pre-Treatment Solution (x20)			
· Dako Wash Buffer (x20)			
· Dako Pepsin Solution			
· Dako Stringent Wash Buffer (x20)			
· Dako Coverslip sealant			
· Dako Fluorescence Mounting Medium			
Agilent ISH Pepsin Kit*	Agilent	G9411A	48 ml Pepsin,
			48 ml Pepsin Diluent
			(10x)
Agilent FISH FFPE Hybridization Buffer	Agilent	G9410A	1 vial, 100μL/vial
FISH Mounting Buffer with DAPI**	Agilent	G9404A	1 vial, 100μL/vial

<sup>\*</sup> ペプシンはDAKO Histology Accessory Kit (品番 K5799) に含まれます。Agilent ISH Pepsin Kit (品番 G9411A) はプロトコルにより追加のペプシンが必要なときにお使いください。

但し、シングル・ダブルフィルタのご使用をお勧めいたします。(シグナル強度や光安定性が良くなります)

## (ハイブリダイゼーション時間:60-120分)

品名	販売メーカ	品番	備考
Dako Histlogy Accesory Kit	Agilent, Dako	K5799	
· Dako Pre-Treatment Solution (x20)			
· Dako Wash Buffer (x20)			
· Dako Pepsin Solution			
· Dako Stringent Wash Buffer (x20)			
· Dako Coverslip sealant			
· Dako Fluorescence Mounting Medium			
Agilent ISH Pepsin Kit*	Agilent	G9411A	48 ml Pepsin,
			48 ml Pepsin Diluent
			(10x)
Agilent IQFISH Fast Hybridization Buffer	Agilent	G9415A	1 vial, 200μL/vial
	Agilent	G9416A	6 vials, 200µL/vial
FISH Mounting Buffer with DAPI**	Agilent	G9404A	1 vial, 100µL/vial

<sup>\*</sup> ペプシンはDAKO Histology Accessory Kit (品番 K5799) に含まれます。Agilent ISH Pepsin Kit (品番 G9411A) はプロトコルにより追加のペプシンが必要なときにお使いください。

但し、シングル・ダブルフィルタのご使用をお勧めいたします。(シグナル強度や光安定性が良くなります)

#### ■ 共通

品名	販売メーカ	品番	備考
Hybridizer	Dako	S245030	
Hybridizer Humidity Control Strips	Dako	S245030-2	

<sup>\*\*</sup> DAPI/FITC/Cy3 triple filterを使用している場合にのみお使いください。

<sup>\*\*</sup> DAPI/FITC/Cy3 triple filterを使用している場合にのみお使いください。

# 2. 非 FFPE 試料の FISH 操作手順 (オーバーナイトハイブリダイゼーション)

# 必要な試薬と機器

品名	販売メーカ	品番	備考
染色体標本が固定された			
スライド標本			
FISH Hybridization Buffer	Agilent	G9400A	1 vial, 100μL/vial
FISH Wash Buffer 1	Agilent	G9401A	1 bottle, 500mL/bottle
FISH Wash Buffer 2	Agilent	G9402A	1 bottle, 500 mL/bottle
FISH Mounting Buffer			1 vial, 100μL/vial
with DAPI	Agilent	G9404A	
without DAPI	Agilent	G9403A	
温浴槽			
蛍光標識FISHプローブ			
カバーグラス			
ラバーセメント			例:ペーパーボンド(KOKUYO,
			型式 夕-100)
			もしくはDako Histlogy
			Accesory Kit [K5799]中の
			Dako Coverslip sealant
Hybridizer	Dako	S245030	もしくは相当品
Hybridizer Humidity Control Strips	Dako	S245030-2	
ドーゼ (加熱処理には蓋つきものを準備)			
エタノール, 100%			
蒸留水			
校正した温度計			
適切なfilter cubeを装着した蛍光顕微鏡			

# 実施内容により必要になりうるもの

品名	販売メーカ	品番	備考
Formamide			変性・ハイブリダイゼーション
Formamide			のときにに必要な場合がある
30x 55C			変性・ハイブリダイゼーション
20x SSC			のときにに必要な場合がある
Nuclease-free7K			プローブハイブリミックス調製
			時に必要な場合がある

## 操作手順

## 1. プローブハイブリダイゼーションミックスの調製

1. 1.5ml の遠心チューブに、表1のものを混合します。必要に応じて量を調節してください。

(22mm x 22mm 1スライドの目安: 10μL 18 mm x 18mm 1スライドの目安: 5μL)

Note プローブハイブリダイゼーションミックスは氷上に置かないでください。

**Note** 蛍光標識プローブは光により劣化します。光による退色を極力避けるために、プローブおよびプローブが含まれるいずれの混合物はなるべく遮光してください。

#### 表1

	1スライド分の容量
	(例:22mmx22mm のカバーガラスの場合)
FISH Hybridization Buffer	7μΙ
標識 FISH プローブ	Χ μΙ (一般的に 1μΙ / プローブ、
	1混合あたり上限3種 のプローブまで)
Nuclease-free 水	Y μl (mix のトータル容量が <b>10μl</b> になるように加える)

2. 内容物をよく混和させるために、チューブを何回か指ではじくか、もしくは数秒のボルテクスをかけます。そのあと、内容物をチューブの底に集めるために、遠心チューブを短時間遠心します。

次の「プローブと染色体 DNA の変性・ハイブリダイゼーション」の行程に進みます。

ハイブリダイゼーションミックスは氷上に置かないでください。

## 2. プローブと染色体DNAの変性・ハイブリダイゼーション

注意 試料スライドがホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織を含む場合は、このプロトコルを使用しないでください。FFPE 試料で FISH を実施するときは、「4. FFPE 試料の FISH 操作手順」に記載されているプロトコルをお使いください。

FISH プローブをスライド上の染色体にハイブリダイゼーションする前に、プローブと染色体 DNA を変性して 1 本鎖 DNA にする必要があります。下記 2 通りの変性方法のうち、いずれか 1 つを選んでください。

#### 2-A. FISH プローブと染色体 DNA を一緒に変性する方法

このプロトコルでは、最初にスライドを変性用に準備し、次にプローブハイブリダイゼーションミックスをスライドに載せます。その後、スライドを 78℃で処理することによりプローブと染色体 DNA を一緒に変性します。この操作の後は、「**スライドの洗浄**」行程にすすみます。

#### 2-B. FISH プローブと染色体 DNA を別々に変性する方法

このプロトコルでは、プローブハイブリダイゼーションミックスをスライドに載せる前に、それぞれを変性温度の73℃で加熱します。細胞の種類によっては、この方法で、よりよい結果が得られることがあります。この操作の後は、「**スライドの洗浄**」行程にすすみます。

#### 2-A. プローブと染色体DNAを一緒に変性する方法

#### 2-A-1. スライドの脱水

- 1. 染色体標本スライドを-20℃から取り出し、室温に10~30分間置きます。
- 2. 下記の試薬を各ドーゼに準備します。もしスライドにラベルが貼ってある場合は、染色体標本 領域が十分に漬かり、かつラベルが漬からない程度の量をドーゼに入れてください。 スライドラックに入れたスライドを下記の順にそれぞれの溶液に浸漬します。(1回の処理、 最大5スライドまで)
  - 1) 70% エタノール: 1分(室温)
  - 2) 85% エタノール: 1分(室温)
  - 3) 100% エタノール: 1分(室温)
- 3. スライドを取り出し、室温にて完全に風乾します。

#### 2-A-2. プローブと染色体DNAを一緒に変性する

- 1. スライドが乾いた後、プローブハイブリダイゼーションミックスを標本に載せます。
  - 1) 染色体展開領域が覆われるように、プローブハイブリダイゼーションミックスを載せます。 その後、ただちにカバーガラスを被せます。
  - 2) カバーガラスの表面を穏やかに押すか軽くタッピングし、気泡が残らないように液を均一に広げます。カバーガラスがスライド上を動き回らないようにします。
  - 3) カバーガラスの外周すべてにラバーセメントを塗布し、カバーガラスを密封します。 変性・ハイブリダイゼーションの間にプローブハイブリダイゼーションミックスが蒸発し ないよう、カバーガラスの外周全てがラバーセメントで密封されていることを確認します。
  - 4) 1)~3) の手順をすべてのスライドに行います。
- 2. スライドを 78℃で 5 分間処理し、DNA を変性します。 この処理は、ヒートブロック上、もしくは Dako Hybridizer か ハイブリダイゼーションチャンバで行ってください。検出する細胞種に応じて、最適な結果が得られるよう、この行程の処理時間と温度を調整する必要がある場合もあります。

## 2-A-3. プローブを染色体にハイブリダイゼーションする

スライドを 37℃に移し、1 晩処理します。

この処理は Dako Hybridizer もしくはその他のハイブリダイゼーションチャンバで、<mark>遮光・湿潤</mark> 環境下で行ってください。

2, 3 の工程を Dako Hybridizer で実施する場合のプログラム設定

DNA 変性: 78℃ 5分

ハイブリダイゼーション:37℃1晩

処理終了後、「スライドの洗浄」行程に進みます。

#### 2-B. プローブと染色体DNAを別々に変性する方法

## 2-B-1. 前準備

- 1. 染色体標本スライドを-20℃から取り出し、室温に10~30分間置きます。
- 2. 下記のものを混合し、変性液 100 ml を調製します。
  - 70 ml formamide
  - 10 ml 10x SSC
  - 20 ml nuclease free 蒸留水

Note 準備する試薬の量は容器の大きさにあわせて調整してください。

- 3. 蓋つきのドーゼに変性液を満たし、下記手順により液を 73℃に温めます。
  - 1) ドーゼの蓋を閉め、室温水の入った恒温槽に入れます。
  - 2) 恒温槽を 73℃に設定します。
  - 3) 30 分間、ドーゼを恒温槽で加温します。

Note ドーゼを 73℃の恒温水槽に直接いれると割れることがあります。

- 4. 下記の試薬を各ドーゼに準備します。もしスライドにラベルが貼ってある場合は、染色体標本 領域が十分に漬かり、かつラベルが漬からない程度の量をドーゼに入れてください。
  - 70% エタノール
  - 85% エタノール
  - 100% エタノール

#### 2-B-2. 染色体DNAの変性と脱水

校正した温度計を用いて、ドーゼ中の変性液の液温が 73℃に上がっていることを事前に必ず確認します。温めた変性液の入ったドーゼにスライドを入れ、ドーゼの蓋を閉め、73℃で5分間浸漬します(最大5スライドまで)。

検出する細胞種に応じて、最適な結果が得られるよう、この変性行程の浸漬時間と温度を調整 する必要がある場合もあります。

- 2. スライドを下記の順にそれぞれの溶液にうつし、浸漬します。(最大5スライドまで)
  - 1) 70% エタノール: 1分(室温)
  - 2) 85% エタノール: 1分(室温)
  - 3) 100% エタノール: 1分(室温)
- 3. スライドを取り出し、室温にて完全に風乾します。

#### 2-B-3. プローブを変性する

スライドを乾燥させている間に、プローブハイブリダイゼーションミックスを 73℃で 5 分間処理 し、プローブ DNA を変性します。

## 2-B-4. プローブを染色体にハイブリダイゼーションする

- 1. スライドが乾いた後、染色体展開領域が覆われるように、プローブハイブリダイゼーションミックスを載せます。その後、ただちにカバーガラスを被せます。
- 2. カバーガラスの表面を穏やかに押すか軽くタッピングし、気泡が残らないように液を均一に広げます。カバーガラスがスライド上を動き回らないようにします。
- 3. カバーガラスの外周すべてにラバーセメントを塗布し、カバーガラスを密封します。 ハイブリダイゼーションの間にプローブハイブリダイゼーションミックスが蒸発しないよう、カバーガラスの外周すべてがラバーセメントで密封されていることを確認します。
- 4. 1~3 の手順をすべてのスライドに行います。
- 5. スライドを 37℃に移し、1 晩処理します。
  この処理は Dako Hybridizer もしくはその他のハイブリダイゼーションチャンバで、<mark>遮光・湿潤環境下</mark>で行ってください。

5 の工程を Dako Hybridizer で実施する場合のプログラム設定 ハイブリダイゼーション: 37℃ 1 晩

処理終了後、「スライドの洗浄」行程に進みます。

## 3. スライドの洗浄

- 蓋つきのドーゼに FISH Wash Buffer 1 を満たし、下記手順により液温を 73℃に温めます。 校正した温度計を用いて、ドーゼ中の FISH Wash Buffer 1 の液温が 73℃に上がっていることを事前に必ず確認します。
  - 1) ドーゼの蓋を閉め、室温水の入った温度調節機能付き恒温槽に入れます。
  - 2) 恒温槽を 73℃に設定します。
  - 3) 30 分間、ドーゼを恒温槽で加温します。

Note ドーゼを 73℃の恒温槽に直接いれると割れることがあります。

- 2. もう1つドーゼを準備し、FISH Wash Buffer 2 を満たします。室温に置きます。
- 3. 1 枚のスライドのカバーガラスを注意して取り外し、ただちにスライドを温めた FISH Wash Buffer 1 に入れます。スライドをドーゼ中で 2~3 回上下させ撹拌します。この操作を全てのスライドで行います(上限 5 スライドまで)。
- スライドを FISH Wash Buffer 1 の入ったドーゼ中に沈めて、ドーゼの蓋を閉め、73℃で 2 分間浸漬します。
- 5. スライドを FISH Wash Buffer 2(室温)の入ったドーゼに移します。移すときに、各スライドをドーゼ中で 2~3 回上下させます。
- 6. スライドを FISH Wash Buffer 2 の入ったドーゼ中に沈めて、室温で 1 分間浸漬します。
- 7. スライドをドーゼから取り出し、注意してスライド上に残ったラバーセメントを取り除きます。 スライドを<mark>室温・遮光</mark>にて風乾します。
- 8. 4~7 の操作を全てのスライドで行います。 1 回の操作で 5 スライド以上を処理しないでください。
- 9. 完全に乾くまでスライドを風乾します。

スライドが乾いた後、「**スライドの観察**」行程にすすむか、もしくは、後日観察するまでスライドを -20℃(遮光にて)保存します。保存したスライドは観察する前に室温にもどします。

## 4. スライドの観察

1. FISH Mounting Buffer (with もしくは without DAPI) を染色体展開領域が覆われるよう、スライドに載せます。ただちにカバーガラスをかぶせます。

(22mm x 22mm 1スライドの目安: 10µL)

- 2. カバーガラスの表面を穏やかに押すか軽くタッピングし、気泡が残らないように液を均一に広げます。
- 3. スライドを蛍光顕微鏡で観察します。

観察後のスライドは4℃(遮光にて)で保存してください。(1週間以内)

# 3. 非 FFPE 試料の FISH 操作手順 (IQFISH Fast Hybtidization Buffer を用いた方法)

注意 試料スライドがホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織を含む場合は、このプロトコルを使用しないでください。FFPE 試料で FISH を実施するときは、「4. FFPE 試料の FISH 操作手順」に記載されているプロトコルをお使いください。

# 必要な試薬と機器

品名	販売メーカ	品番	備考
染色体標本が固定された			
スライド標本			
Dako Cytology FISH Accesosory Kit	Dako	K5477	
• Dako Wash Buffer (x20)			
· Dako Stringent Wash Buffer (x20)			
· Dako Coverslip sealant			
Dako Fluorescence Mounting Medium			
Agilent IQFISH Fast Hybridization Buffer	Agilent	G9415A	1 vial, 200μL/vial
温浴槽			
蛍光標識FISHプローブ			
カバーグラス			
ラバーセメント			例:ペーパーボンド(KOKUYO,
			型式 夕-100)
			もしくはDako Histlogy
			Accesory Kit [K5799]中の
			Dako Coverslip sealant
Hybridizer	Dako	S245030	もしくは相当品
Hybridizer Humidity Control Strips	Dako	S245030-2	
ドーゼ (加熱処理には蓋つきものを準備)			
エタノール, 100%			
蒸留水			
2x SSC			
校正した温度計			
適切なfilter cubeを装着した蛍光顕微鏡			
FISH Mounting Buffer with DAPI*	Agilent	G9404A	1 vial, 100μL/vial

<sup>\*</sup> DAPI/FITC/Cy3 triple filterを使用している場合にのみお使いください。

但し、シングル・ダブルフィルタのご使用をお勧めいたします。(シグナル強度や光安定性が良くなります)

## 1. スライドの調製

- 1. 下記の試薬を各ドーゼに準備します。もしスライドにラベルが貼ってある場合は、染色体標本領域が十分に漬かり、かつラベルが漬からない程度の量をドーゼに入れてください。
  - 70% エタノール (室温)
  - 85% エタノール (室温)
  - 100% エタノール (室温)
- 2. 2x SSC 50ml を耐熱性のある蓋つきの容器 (ドーゼ) に調製します。

**Note** 2x SSC の代わりに、MES ベースの前処理試薬の使用も可能です。DAKO Pre-Treatment Solution (DAKO Histology Accesory Kit に含まれます)も使用可能です。

以下のものを混合し、1x Dako Wash Buffer 500 ml を調製します。
 25ml 20x Dako Wash Buffer
 475 ml H<sub>2</sub>O

本プロトコルに記載されている容量はドーゼを使用する場合を想定しております。容量はお使いになる容器に応じて変更いただけます。例えば、staining dish をご使用の場合は、各工タノール溶液を 200 ml、2x SSC を 200mL、1x Dako Wash Buffer を 2L 調製してください。

## 2. スライドの前処理

この操作では、沸騰直前の温度に保った 2x SSC でスライドを処理します。液温を沸騰温度直前に保ったまま処理することが、このステップでは重要です。

 $%1 \sim 3$  の手順において温浴漕を用いる際は、スライドを 2xSSC に浸漬する前に、校正した温度計を用いて、ドーゼ中の希釈済み Pre-treatment solution 液温が 95  $^\circ$ -99  $^\circ$  (沸点の 100  $^\circ$   $^\circ$   $^\circ$  到達しないようにします)に上がっていることを事前に必ず確認します。温度を確実に上げるため必ず蓋つきの温浴槽を使用してください。

1. 50mL 2x SSC に、スライドを浸漬し、緩くドーゼの蓋をします。

**Note** ドーゼの蓋を半分あけるか、予め蓋に穴を開けるなどして、スライドの入ったドーゼから蒸気が逃げるようにしてください。

- 2. ドーゼを 1100 W のマイクロウェーブオーブンに入れ、100%の power で、溶液が沸騰し始めるまで加熱します(約  $1\sim3$  分)。溶液が沸騰し始めたら速やかに 3 の手順に進みます。
- 3. マイクロウェーブで 10~20%の power にて加熱することで、溶液を沸騰する温度直前に保 ちながら 10 分間処理します。10 分間の処理の間は、溶液を目視で確認し、沸騰が起こってい るようであれば power レベルを下げます。
- 4. ドーゼをマイクロウェーブから取り出し、注意してドーゼのふたを開け、室温で 15 分間放置 します。(スライドは浸漬したままです。)
- 5. スライドを 1x Dako Wash Buffer に移し、室温にて 3 分間浸漬します。
- 6. さらに新しい 1x Dako Wash Buffer に換え、スライドを室温にて 3 分間浸漬します。
- 7. スライドを下記の順にそれぞれの溶液に浸漬します。
  - 1) 70% エタノール: 1-2分(室温)
  - 2) 85% エタノール: 1-2分(室温)
  - 3) 100% エタノール: 1-2分(室温)
- 8. スライドを取り出し、室温にて完全に風乾します。その間に次の手順で FISH プローブの調製を行います。

## 3. プローブハイブリダイゼーションミックスの調製

1. IQFISH Fast Hybridization Buffer のバイアルを室温で溶かします。(室温放置は 30 分以内)溶かしたあと、軽い遠心操作により内容物をチューブの底に集め、粘性があるため 15 秒以上のボルテクスにより完全に混合してください。最後の混合のあとは**遠心をしないで**そのまま使用します。

**Note** 凍結融解をおこなうと IQFISH Fast Hybridization Buffer は 2 層に分かれていることがあります。使用前によく混合され、均一になっていることを確認してください。

**Note** IQFISH Fast Hybridization Buffer の凍結融解は最大 10 回までです。

- 2. プローブを室温で溶かします。ボルテクスをかけ、そのあと、軽く遠心し、内容物をチューブの底に集めます。
- 3. 1.5ml の遠心チューブに、表2のものを混合します。必要に応じて量を調節してください。(22mm x 22mm 1スライドの目安: 10µL)粘性があるためボルテクスミクスでよく混合します。

**Note** 分離することがあるので試料に滴下する前は**遠心をかけない**でください。

Note プローブハイブリダイゼーション ミックスは氷上に置かないでください。

**Note** 蛍光標識プローブは光により劣化します。光による退色を極力避けるために、プローブおよびプローブが含まれるいずれの混合物はなるべく<u>遮光</u>してください。

#### 表 2

	1スライド分の容量		
	(例:22mmx22mm のカバーガラスの場合)		
Agilent IQFISH Fast Hybridization Buffer	9μ		
標識 FISH プローブ	X μ (通常 1μ/プローブ)、3μ まで*		

\*標識 FISH プローブがプレミックスタイプのもの(orange-red のプローブと green のプローブが 1 本のチューブに合わせ入っているもの)の場合、プレミックスプローブを 1  $\mu$ L 加えてください。別の色の標識 FISH プローブが別々のチューブに入っている場合は、各色のプローブを 1  $\mu$ L ずつ加えてください。

4. 内容物をよく混和させるために、チューブを何回か指ではじくか、もしくは数秒のボルテクスをかけます。分離することがあるので試料に滴下する前は遠心をかけないでください。次の「プローブと染色体 DNA の変性・ハイブリダイゼーション」の行程に進みます。ハイブリダイゼーションミックスは氷上に置かないでください。

## 4. DNA変性およびFISHプローブのハイブリダイゼーション

#### 4-1. プローブミックスの滴下・シーリングとDNA変性

スライドが乾いた後、プローブハイブリダイゼーションミックスを標本に載せます。

- 1. 染色体展開領域が覆われるように、プローブハイブリダイゼーションミックスを載せます (22mm x 22mm の場合 10μl)。その後、ただちにカバーガラスを被せます。
- 2. カバーガラスの表面を穏やかに押すか軽くタッピングし、気泡が残らないように液を均一 に広げます。カバーガラスがスライド上を動き回らないようにします。
- 3. Dako Coverslip Sealant をカバーガラス外周すべてに塗布し、カバーガラスを密封します。

変性・ハイブリダイゼーション処理の間に溶液が蒸発しないよう、カバーガラスの外周すべてが Dako Coverslip Sealant で密封されていることを確認します。

- 4. 1)~3) の手順をすべてのスライドに行います。
- 5. スライドを 66℃で 10 分間処理し、DNA を変性します。

この処理は、ヒートブロック上、もしくは Dako Hybridizer か ハイブリダイゼーションチャンバで行ってください。検出する細胞種に応じて、最適な結果が得られるよう、この行程の処理時間と温度を調整する必要がある場合もあります。

## 4-2. プローブを染色体にハイブリダイゼーションする

スライドを 45℃に移し、90 分処理します。

この処理は Dako Hybridizer もしくはその他のハイブリダイゼーションチャンバで、<mark>遮光・</mark> <u>湿潤環境下</u>で行ってください。

4-1, 4-2 の工程を Dako Hybridizer で実施する場合のプログラム設定

DNA 変性: 66℃ 10分

ハイブリダイゼーション:45℃ 90分

処理終了後、「**スライドの洗浄**」行程に進みます。

**Note** 2x SSC でスライドの前処理を行うことなく、非 FFPE 試料を IQFISH Fast Hybridization Buffer で FISH アッセイを実施することが出来ますが、その際は以下の内容に従ってください。

p.18 の「2. スライドの前処理」の Step 1 から 4 を省き、直接エタノールによる脱水のステップ(Step 5)から手順を始めます。

p.20 「4-1. プローブミックスの滴下・シーリングと DNA 変性」の Step 5 の条件を(66℃ 10 分から)90℃ 5 分に変更します。

p.22 「5-2. カバーガラスの除去と洗浄」の Step 3 でスライドを 63℃ Dako Stringent Wash の Buffer で 10 分間処理したあと、すぐに 37℃の蒸留水で 1 分間処理し、Step 4 にすすみます。

#### 【37℃の蒸留水で1分間処理】

- 蒸留水の入ったドーゼを1つ準備し、室温水の入った温浴槽に入れます。温浴槽の温度を 37℃に設定し、温浴槽の蓋も閉め、加温します。校正した温度計を用いて、ドーゼ中の液 温が37℃に上がっていることを事前に必ず確認します。
- 37℃の蒸留水による処理内容:スライドを37℃の蒸留水の入ったドーゼへ移します。スライドを液中で上下に10秒ほど振ります。スライドをさせ、ドーゼの蓋と、温浴槽の蓋を閉め、スライドを1分間処理します。(時間厳守)

ただし、上記の変更を実施しても、2xSSC による前処理を省略することはプローブのシグナル 形態に悪く影響することがあります。

## 5. スライドの洗浄

#### 5-1. 前準備

1. 20x Dako Stringent Wash Buffer を、蒸留水にて 20 倍に希釈調製します。用時調製です。

**Note** 準備する試薬の量は容器の大きさにあわせて調整してください。

- 2. 希釈済み Dako Stringent Wash Buffer の入った2つのドーゼを準備します。
  一つは室温にしておきます。もう一つのドーゼを下記手順にて予め63℃に温めます。63℃に温
  めるドーゼは蓋があるものを使用してください。校正した温度計を用いて、ドーゼ中の希釈済
  み Pre-treatment solurion 液温が63℃に上がっていることを事前に必ず確認します
  - 1) 希釈済み Dako Stringent Wash Buffer の入ったドーゼ (蓋をします) を、室温水の入った温浴槽に入れます。
  - 2) 温浴槽の温度を63℃に設定し、温浴槽の蓋も閉め、加温します。

Note 常温の溶液の入ったドーゼを 63℃の温浴槽に直接いれると割れることがあります。

## 5-2. カバーガラスの除去と洗浄

- 1. Dako Hybridizer からスライドを取り出し、室温の希釈済み Stringent Wash Buffer に漬浸します。
- 2. 5分ほど放置したあとスライドを取りだし、Coverslip Sealant を鉗子などでゆっくりと取り除きます。スライドを1で使用した室温の希釈済み Stringent Wash Buffer にもどし、液中でカバーガラスを注意して取り外します。(カバーガラスを横にそっとずらしながら行うと外し易いです。)
- 3. スライドを 63℃の希釈済み Stringent Wash Buffer の入ったドーゼ(63℃の温浴槽内)に移 します。スライドを液中で上下に 10 秒間振ります。ドーゼの蓋と、温浴槽の蓋を閉め、スラ イドを 10 分間処理します。(時間厳守)
- 4. スライドを 1x Dako Wash Buffer (室温) の入ったドーゼに移し、室温で1分間処理します。
- 5. スライドを 1x Dako Wash Buffer (室温) の入った別のドーゼに移し、室温で 3 分間処理します。

## 6. 脱水

1. 下記の試薬を各容器(ドーゼ)に準備します。スライドラックに入れたスライドを下記の順に それぞれの溶液に浸漬します。

1) 70% エタノール: 1分(室温)

2) 85% エタノール: 1分(室温)

3) 100% エタノール: 1分(室温)

2. スライドを取り出し、室温にて完全に風乾します。

#### 7. 標本作成と顕微鏡による観察

1. Dako Fluorescence Mouting Medium (10-15µL/スライド程度) を試料上に滴下し、ただちにカバーガラスをかぶせます。

**Note** DAPI/FITC/Cy3 triple フィルターを使用している場合は、光による退色を軽減させるために Dako Fluorescence Mouting Medium の代わりに Agilent FISH Mounting Buffer with DAPI (G9404A) を使用してください。

- 2. カバーガラスの表面を鉗子などで穏やかに押すか軽くタッピングし、液を均一に広げます。できれば気泡が残らないようにします。
- 3. スライドを 15 分ほど冷暗所に静置したのち、適合するフィルターを搭載した蛍光顕微鏡で観察します。

観察後のスライドは4℃(遮光にて)で保存してください。(1週間以内)

## 4. FFPE 試料の FISH 操作手順

# 必要な試薬と機器

品名	販売メーカ	品番	備考
ホルマリン固定パラフィン包埋組織切片の			
スライド標本			
Dako Histlogy Accesory Kit	Agilent, Dako	K5799	
· Dako Pre-Treatment Solution (x20)			
· Dako Wash Buffer (x20)			
· Dako Pepsin Solution			
· Dako Stringent Wash Buffer (x20)			
· Dako Coverslip sealant			
· Dako Fluorescence Mounting Medium			
Agilent ISH Pepsin Kit*	Agilent	G9411A	48 ml Pepsin,
			48 ml Pepsin Diluent
			(10x)
キシレン (またはキシレン代用物質)			例:CitriSolv
温浴槽(蓋つき)			
下記のいずれか1つ			
Agilent FISH FFPE Hybridization Buffer	Agilent	G9410A	1 vial, 100µL/vial
Agilent IQFISH Fast Hybridization Buffer	Agilent	G9415A	1 vial, 200µL/vial
	Agilent	G9416A	6 vials, 200µL/vial
蛍光標識FISHプローブ			
カバーグラス			
Hybridizer	Dako	S245030	もしくは相当品
Hybridizer Humidity Control Strips	Dako	S245030-2	
ドーゼ(加熱処理には蓋つきものを準備)			
エタノール, 100%			
蒸留水			
校正した温度計			
適切なfilter cubeを装着した蛍光顕微鏡			
リントフリーティッシュ(例:キムワイプ)			
FISH Mounting Buffer with DAPI**	Agilent	G9404A	1 vial, 100µL/vial

<sup>\*</sup> ペプシンはDAKO Histology Accessory Kit (品番 K5799) に含まれます。Agilent ISH Pepsin Kit (品番 G9411A) はプロトコルにより追加のペプシンが必要なときにお使いください。

但し、シングル・ダブルフィルタのご使用をお勧めいたします。(シグナル強度や光安定性が良くなります)

## 実施内容により必要になりうるもの

品名	販売メーカ	品番	備考
Nuclease-free7K			プローブハイブリミック
			ス調製時に必要な場合が
			ある

<sup>\*\*</sup> DAPI/FITC/Cy3 triple filterを使用している場合にのみお使いください。

## 操作手順

本内容は、10%中性緩衝ホルマリン液で保存した(固定時間 18-24 時間)パラフィン包埋組織(4-6  $\mu$ m (Breast)・ $3-6\mu$ m (gaster) 薄切)を想定した内容になっておりますので、組織試料の種類、固定化や包埋の方法の違いにより、前処理・ペプシン処理の最適処理条件が異なることがあります。

## 1. 前準備

Note 準備する試薬の量は容器の大きさにあわせて調整してください。

- 20x Dako Wash Buffer を、蒸留水にて 20 倍に希釈調製します。
   Wash Buffer は希釈後の保存が可能です(4℃保存)。使用時は常温に戻して使用します。
- 2. 20x Dako Pre-Treatment Solution を、蒸留水にて 20 倍に希釈調製します。用時調製です。 蓋つきの容器(ドーゼ)に入れ、下記手順により予めドーゼ内の液温を 95-99℃にしておきます。 (加熱中は必ず温浴槽と容器、両方とも蓋をしておきます。)
  - 1) 希釈済み Dako Pre-Treatment Solution の入った蓋つきのドーゼ(蓋をします)を、室温水の入った温浴槽に入れます。
  - 2) 温浴槽の温度を 98-99℃に設定し、温浴槽の蓋も閉め、1時間ほど加温します。

Note 常温の溶液の入ったドーゼを 98-99℃の温浴槽に直接いれると割れることがあります。

Note 温度を確実に上げるため必ず蓋つきの温浴槽を使用してください。

#### 2. 試料の脱パラフィンと親水化

- FFPE 試料切片をスライドに載せ 60℃で 1 時間処理します。
   この処理はインキュベーターで行います。通常スライドラックにスライドを並べ処理を行いますが、パラフィンが溶けるためスライドは水平よりも垂直に置くことをお勧めいたします。
- 2. 下記の試薬を各容器(ドーゼ)に準備します。スライドラックに入れたスライドを下記の順に それぞれの溶液に浸漬します。
  - 1) キシレン(もしくはキシレン代用物質): 5分(室温)
  - 2) キシレン(もしくはキシレン代用物質): 5分(室温)
  - 3) 100% エタノール: 2分(室温)
  - 4) 100% エタノール: 2分(室温)
  - 5) 70% エタノール: 2分(室温)
  - 6) 70% エタノール: 2分(室温)
  - 7) Dako Wash Buffer: 2-5 分 (室温) (→次のステップにすすむまで漬けたままにします)

**Note** 溶液間でスライドラックを移すときは、毎回、試料を乾かさない程度に余分な溶液を落とします。

## 3. 温浴槽による事前の加熱処理

この操作では、95-99℃に保った希釈済み Dako Pre-Treatment Solution でスライドを処理します。校正した温度計を用いて、ドーゼ中の希釈済み Pre-treatment solution 液温が 95℃-99℃ (沸点の 100℃に到達しないようにします) に上がっていることを事前に必ず確認します。液温を 95℃以上に保ったまま処理することが、このステップでは重要です。

この操作のあとは「4.ペプシンによるタンパク質分解」の手順に進みます。

※マイクロウェーブによる加熱処理を行われる場合は事前に弊社カスタマーサポートまでご連絡ください。

9. 95℃-99℃の希釈済み Dako Pre-Treatment Solutuion (98-99℃に設定した温浴槽内に入ったままの状態) に、スライドを浸漬し、ドーゼと温浴槽の蓋をし、10 分間処理します。

**Note** スライドの入ったドーゼと恒温槽の、両方の蓋を必ず閉めて処理します。

- 10. ドーゼごと恒温槽から取り出し、注意してドーゼのふたを開け、室温で 15 分間放置します。 (スライドは浸漬したままです。)
- 11. スライドを希釈済み Dako Wash Buffer に移し、室温にて 3 分間浸漬します。
- 12. さらに新しい希釈済み Dako Wash Buffer に換え、スライドを室温にて 3 分間浸漬します。 (ペプシン処理にすすむまでスライドを外に出さない)

## 4. ペプシンによるタンパク質分解

この操作では、サンプル中に含まれるタンパク質をペプシンで分解します。分解はペプシンの液 滴の添加(オプション 1)もしくはペプシン漕によるバッチ処理(オプション 2)を実施します。 この操作のあとは「5.脱水」の手順に進みます。

## Option 1: ペプシンの液滴によるタンパク質分解

- 1. スライドを取り出し、試料に触れないようにスライドの余分な溶液をキムワイプ(もしくは他のリントフリーティッシュ)で注意して除去します。(試料は絶対に乾燥させないよう注意します。)
- 2. 直前に冷蔵庫から取り出した、冷たい状態の(2~8℃) Dako Pepsin Solution (Dako Histology Kit もしくは Agilent ISH Pepsin Kit) を 5-8 滴程度 (試料を覆えるくらい) 滴下します。

**Note** Dako Pepsin Solution はいつも 2-8℃で保存します。

3. ペプシンを載せたスライドを、ペプシンが載っている面を上側にして、37℃のホットプレート もしくは Dako Hybridizer 上におき、37℃で 3-18 分間処理します。

**Note** 組織の種類、固定化や包埋の方法の違いにより、手順 3 における最適処理条件が異なることがあります。まずは 6 分間の処理から試されることをお勧めします。

- 4. スライド上の余分な Pepsin を落とします。
- 5. スライドを希釈済み Dako Wash Buffer に移し、室温にて 3 分間浸漬します。
- 6. さらに新しい希釈済み Dako Wash Buffer に換え、スライドを室温にて 3 分間浸漬します。

## Option 2: ペプシン漕によるタンパク質分解のバッチ処理

 Pepsin と Pepsin Diluent (Dako Histology Accessory Kit もしくは Agilent ISH Pepsin Kit) を用いて希釈したペプシン溶液を調製し、耐熱性のドーゼに入れます。Pepsin と Pepsin Diluent を蒸留水で 1:10 に希釈します。

希釈例: 1x Pepsin solution 60 ml の場合

- Pepsin 6 ml
- 10x Pepsin Diluent 6 ml
- 蒸留水 48 ml
- 2. 調製したペプシン溶液の入った耐熱性のドーゼを 37℃の温浴漕に入れ、予め溶液を 37℃に加熱します。
- 3. 37℃のペプシン溶液にスライドを浸漬し、37℃で 30 分間処理します。

Note 組織の種類、固定化や包埋の方法の違いにより、手順3における最適処理条件が異なることがあります。まずは30分間の処理から試されることをお勧めします。

- 4. スライドを希釈済み Dako Wash Buffer に移し、室温にて 3 分間浸漬します。
- 5. さらに新しい希釈済み Dako Wash Buffer に換え、スライドを室温にて 3 分間浸漬します。

## 5. 脱水

- 1. 下記の試薬を各ドーゼに準備します。スライドラックに入れたスライドを下記の順にそれぞれの溶液に浸漬します。
  - 4) 70% エタノール: 2分(室温)
  - 5) 85% エタノール: 2分(室温)
  - 6) 100% エタノール: 2分(室温)
- 2. スライドを取り出し、室温にて完全に風乾します。

# 6. DNA変性およびFISHプローブのハイブリダイゼーション

ここでは2つのハイブリダイゼーションプロトコルが記述されています。お使いのハイブリダイゼーションバッファにあったプローブ調製とハイブリダイゼーション手順にしたがってください。

## 5-A. IQFISH Fast Hybridization Buffer による方法

ハイブリダイザーのプログラム設定 DNA 変性:80℃ 10分

ハイブリダイゼーション:45℃ 60-120分

## 5-B. FISH FFPEHybridization Buffer による方法

ハイブリダイザーのプログラム設定 DNA 変性:90℃ 5分

ハイブリダイゼーション:37℃ 14-20 時間

## 5-A. IQFISH Fast Hybridization Buffer による方法

#### 5-A-1. プローブハイブリダイゼーション ミックスの調製

1. IQFISH Fast Hybridization Buffer のバイアルを室温で溶かします。(室温放置は 30 分以内)溶かしたあと、軽い遠心操作により内容物をチューブの底に集め、粘性があるため 15 秒以上のボルテクスにより完全に混合してください。最後の混合のあとは**遠心をしないで**そのまま使用します。

**Note** 凍結融解をおこなうと IQFISH Fast Hybridization Buffer は 2 層に分かれていることがあります。使用前によく混合され、均一になっていることを確認してください。

**Note** IQFISH Fast Hybridization Buffer の凍結融解は最大 10 回までです。

- 2. プローブを室温で溶かします。ボルテクスをかけ、そのあと、軽く遠心し、内容物をチューブの底に集めます。
- 3. 1.5ml の遠心チューブに、表2のものを混合します。必要に応じて量を調節してください。(22mm x 22mm 1スライドの目安: 10µL)粘性があるためボルテクスミクスでよく混合します。

**Note** 分離することがあるので試料に滴下する前は<mark>遠心をかけない</mark>でください。

Note プローブハイブリダイゼーション ミックスは氷上に置かないでください。

**Note** 蛍光標識プローブは光により劣化します。光による退色を極力避けるために、プローブおよびプローブが含まれるいずれの混合物はなるべく<mark>遮光</mark>してください。

## 表2

	1スライド分の容量	
	(例:22mmx22mm のカバーガラスの場合)	
Agilent IQFISH Fast Hybridization Buffer	9 μ	
標識 FISH プローブ	Χ μ (通常 1μ/プローブ)、3μまで*	

\*標識 FISH プローブがプレミックスタイプのもの(orange-red のプローブと green のプローブが 1 本のチューブに合わせ入っているもの)の場合、プレミックスプローブを 1  $\mu$ L 加えてください。別の色の標識 FISH プローブが別々のチューブに入っている場合は、各色のプローブを 1  $\mu$ L ずつ加えてください。

#### 5-A-2. プローブミックスの滴下・シーリングとDNA変性

- スライドの試料の中央にプローブハイブリダイゼーションミックス(22mm x 22mm の場合 10µl)を滴下し、カバーガラスに被せます。スライドとカバーガラスの間に気泡があるときは、カバーガラスを鉗子などで穏やかにタッピングし、気泡が残らないようにします。
- 2. Dako Coverslip Sealant をカバーガラス外周すべてに塗布し、カバーガラスを密封します。 変性・ハイブリダイゼーション処理の間に溶液が蒸発しないよう、カバーガラスの外周すべ てが Dako Coverslip Sealant で密封されていることを確認します。
- 3. スライドを Dako Hybridizer(もしくは他のハイブリダイゼーションチャンバ)にセット し、Hybrdizer Humidity Control Strips をふたに挿入し、すみやかにふたを閉じます、プログラムをスタートさせます。

■ハイブリダイザーのプログラム設定 DNA 変性:80℃ 10分

ハイブリダイゼーション:45℃ 60-120分

**Note** たいていは80℃の熱変性で高いシグナルが得られますが、もし80℃熱変性の条件でバックグラウンドが高い場合は、熱変性温度を66度まで下げることも可能です。

## 5-B. FISH FFPE Hybridization Bufferによる方法

## 5-B-1. プローブハイブリダイゼーション ミックスの調製

1. 1.5ml の遠心チューブに、表 3 のものを混合します。必要に応じて量を調節してください。 (22mm x 22mm 1 スライドの目安:  $10\mu$ L)

**Note** プローブハイブリダイゼーション ミックスは氷上に置かないでください。

**Note** 蛍光標識プローブは光により劣化します。光による退色を極力避けるために、プローブおよびプローブが含まれるいずれの混合物はなるべく遮光してください。

#### 表3

	1スライド分の容量
	(例:22mmx22mm のカバーガラスの場合)
FISH FFPE Hybridization Buffer	7μΙ
標識 FISH プローブ	通常 1μL/ 1 種のプローブ、
	1ミックスあたり最大3種のプローブ
Nuclease-free 水	ハイブリダイゼーションミックスのトータル容量が
	<b>10μl</b> になるように適宜加える

2. 内容物をよく混和させるために、チューブを何回か指ではじくか、もしくは数秒のボルテクスをかけます。そのあと、軽く遠心し内容物をチューブの底に集めます。

## 5-B-2. プローブミックスの滴下・シーリングとDNA変性

- 1. スライドの試料の中央にプローブハイブリダイゼーションミックス(22mm x 22mm の場合 10µl)を滴下し、カバーガラスに被せます。スライドとカバーガラスの間に気泡があるときは、カバーガラスを鉗子などで穏やかにタッピングし、気泡が残らないようにします。
- 2. Dako Coverslip Sealant をカバーガラス外周すべてに塗布し、カバーガラスを密封します。 変性・ハイブリダイゼーション処理の間に溶液が蒸発しないよう、カバーガラスの外周すべてが Dako Coverslip Sealant で密封されていることを確認します。
- 3. スライドを Dako Hybridizer (もしくは他のハイブリダイゼーションチャンバ) にセットし、 Hybrdizer Humidity Control Strips をふたに挿入し、すみやかにふたを閉じます、プログラムをスタートさせます。

■ハイブリダイザーのプログラム設定

DNA 変性:90℃ 5分

ハイブリダイゼーション:37℃ 14-20 時

## 6. スライドの洗浄

#### 6-1. 前準備

1. 20x Dako Stringent Wash Buffer を、蒸留水にて 20 倍に希釈調製します。用時調製です。

Note 準備する試薬の量は容器の大きさにあわせて調整してください。

2. 希釈済み Dako Stringent Wash Buffer の入った2つのドーゼを準備します。

一つは室温にしておきます。もう一つのドーゼを下記手順にて予め  $63^{\circ}$ ( $\pm 2^{\circ}$ )に温めます。 $63^{\circ}$ に温めるドーゼは蓋があるものを使用してください。

校正した温度計を用いて、ドーゼ中の希釈済み Pre-treatment solution 液温が  $63^{\circ}$ ( $\pm 2^{\circ}$ ) に上がっていることを事前に必ず確認します

- 1) 希釈済み Dako Stringent Wash Buffer の入ったドーゼ (蓋をします) を、室温水の入った温浴槽に入れます。
- 2) 温浴槽の温度を65℃に設定し、温浴槽の蓋も閉め、加温します。

Note もしくは「温浴槽による事前の加熱処理」後(p.25)、温浴槽の設定を 65 度に変更し、 蓋つき耐熱性容器に希釈済み Dako Stringent Wash Buffer を入れ、容器に蓋をして(温浴槽の 蓋はあけておく) 1 時間程度放置する方法などもあります。

Note 常温の溶液の入ったドーゼを 65℃の温浴槽に直接いれると割れることがあります。

#### 6-2. カバーガラスの除去と洗浄

- 1. Dako Hybridizer からスライドを取り出し、室温の希釈済み Stringent Wash Buffer に漬浸します。
- 2. 5分ほど放置したあとスライドを取りだし、Coverslip Sealant を鉗子などでゆっくりと取り除きます。スライドを1で使用した室温の希釈済み Stringent Wash Buffer にもどし、液中でカバーガラスを注意して取り外します。(カバーガラスを横にそっとずらしながら行うと外し易いです。)

- 3. スライドを 63℃の希釈済み Stringent Wash Buffer の入ったドーゼ(65℃の温浴槽内)に移 します。スライドを液中で上下に 10 秒間振ります。ドーゼの蓋と、温浴槽の蓋を閉め、スラ イドを 10 分間処理します。(時間厳守)
- 4. スライドを室温の希釈済み Dako Wash Buffer (注意: Stringent Wash Buffer ではありません) の入ったドーゼへ移します。スライドを 3 分間浸漬します。新しい希釈済み Dako Wash Buffer に換え、さらにスライドを 3 分間浸漬します。

## 7. 脱水

- 1. 下記の試薬を各容器(ドーゼ)に準備します。スライドラックに入れたスライドを下記の順に それぞれの溶液に浸漬します。
  - 4) 70% エタノール: 2分(室温)
  - 5) 85% エタノール: 2分(室温)
  - 6) 100% エタノール: 2分(室温)
- 2. スライドを取り出し、室温にて完全に風乾します。

## 8. 標本作成と顕微鏡による観察

1. Dako Fluorescence Mouting Medium (10-15µL/スライド程度) を試料上に滴下し、ただちにカバーガラスをかぶせます。(カバーガラスは「5. DNA 変性および FISH プローブのハイブリダイゼーション」で使用したものよりも一回り大きいものを使用することをお勧めします)

**Note** DAPI/FITC/Cy3 triple フィルターを使用している場合は、光による退色を軽減させるために Dako Fluorescence Mouting Medium の代わりに Agilent FISH Mounting Buffer with DAPI (G9404A) を使用してください。

- 2. カバーガラスの表面を鉗子などで穏やかに押すか軽くタッピングし、液を均一に広げます。できれば気泡が残らないようにします。
- 3. スライドを 15 分ほど冷暗所に静置したのち、適合するフィルターを搭載した蛍光顕微鏡で観察します。

観察後のスライドは4℃(遮光にて)で保存してください。(1週間以内)

Copyright Agilent Technologies 2011

すべての権利は留保されています。著作権法で認められている場合を除き、本書を許可なく複製、改作、翻訳することは禁止されています。

本和文操作実習テキストの版権は全て Agilent Technologies, Inc.が所有しています。

#### ご注意

本書に記載した内容は、予告なしに変更することがあります。

本書は、内容について細心の注意をもって作成いたしましたが、万一ご不審な点や誤り、記載もれ 等、お気づきの点がございましたら当社までお知らせください。

当社では、下記の項目を補償の対象から除外いたします。

ユーザの誤った操作に起因する機器などの損傷、性能上のトラブル、損害

本キットの本来の用途以外の使用に起因する機器などの損傷、性能上のトラブル、損害

本プロトコルに以外の方法または試薬を用いたことによる性能上のトラブル、損害。

#### 分析結果に基づく損失

本書の内容の一部または全部を無断で複写、転載したり、他の言語に翻訳することは法律で禁止されています。複写、転載などの必要が生じた場合は、当社にお問い合わせください。

本製品パッケージとして提供した本マニュアル、CD-ROM 等の媒体は本製品用にだけお使いください。

#### 保証

本書に記載した内容は、予告なしに変更することがあります。

Agilent Technologies は、本品に関していかなる保証も行いません。これには暗黙の保証、または商品性および特定目的への適合性が含まれますが、それらに限定されません。

Agilent Technologies は、本書に含まれている誤植、あるいは本品の性能、または使用に関する偶発的ないし間接的な損害に関して責任を負いません。

# 本プロトコル・関連試薬に関するサポートお問い合わせ窓口

電話:0120-477-111

E-mail: email\_japan@agilent.com

Agilent FISH 試薬類関連の質問と明示してください。