

<固定、消化>

以下の処理では溶液量は1 mlで行う。細胞数は 3×10^8 の8乗程度。

- 1・固定 EMM2 培養液に直接固定液を加える。
10分の1容量の37%ホルマリン
250分の1容量の25%グルタルアルデヒド
培養温度で10分、グルタルアルデヒドを加えてから遠心まで。
- 2・PEM で1時間程度、液を10分か15分おきに交換しながら洗う。
- 3・消化 0.5 mg/ml Zymolyase 100T + 0.2 mg/ml Novozyme in 1 ml PEMS,
36度。1時間後に等量の酵素をくわえて、さらに1時間。
- 4・PEM で2回程度流す。
- 5・1% TritonX-100 in 1 ml PEM で5分、室温。
- 6・PEM で2回程度洗う。
- 7・クエンチング。
0.1M Glycine PEM で10分、2回。
- 8・PEM で2回程度洗う。
- 9・PEMBL + 0.1 mg/ml RNaseA 1 ml, 36度、4時間から8時間。
オーバーナイトでもよい。1時間程度では不十分な場合がある。

<間接蛍光抗体>

ここからの処理では溶液量は0.2 mlで行う。

- 10・9のサンプルから10の8乗細胞程度(0.2 ml)を集菌して
0.2 ml PEMBL + 適当な1次抗体 室温 数時間
- 11・PEM で3回洗う
- 12・適当な2次抗体(アレクサグリーンを主に使っている) in PEMBL 0.2 ml
室温数時間

<FISH>

- 13・12のサンプルから適当量(半分位)を PEM 0.2 ml で3回洗う。
- 14・後固定、1の場合と同じように
10分の1容量の37%ホルマリン
250分の1容量の25%グルタルアルデヒド in PEM 0.2 ml, 室温15分。
- 15・洗い、クエンチングは6・7と同じように。
- 16・2 X SSC 0.2 ml 15分 室温
- 17・10% ホルムアミド 2 X SSC 0.2 ml 15分 室温
- 18・20% ホルムアミド 2 X SSC 0.2 ml 15分 室温
- 19・40% ホルムアミド 2 X SSC 0.2 ml 15分 室温
- 20・19のサンプルから適当量を 0.1 ml hybridization buffer
+ 適当な蛍光標識したプローブ(テキサスレッド、サイ5を主に使う)にサスペンド
65度 5~10分
- 21・20のサンプルをそのまま36度 数時間
- 22・21のサンプルに 0.025 ml 2 X SSC を加える(最終ホルムアミド濃度40%)
室温 15分
- 23・22のサンプルに 0.125 ml 2 X SSC を加える(最終ホルムアミド濃度20%)
室温 15分
- 24・23のサンプルに 0.250 ml 2 X SSC を加える(最終ホルムアミド濃度10%)
室温 15分
- 25・遠心して 2 X SSC 0.2 ml 室温15分
- 26・PBS + DAPI 5分程度
- 27・適当に濃縮して大きめのカバーガラスの上に200µlのせ、

抗退色剤は、Trolox の飽和水溶液をその都度用意して、0.5 μ l 程度加えて
18mmX18mmのカバーガラスで覆う。しばらく細胞が落ちつくのを待って観察。

PEM: 100 mM PIPES, 1 mM EGTA, 1 mM MgSO₄, pH6.9

PEMS: PEM + 1.2 M sorbitol

PEMBL: PEM + 1% BSA, 100 mM lysine hydrochloride