

アッセイを始める前に

サンプル作製方法の確認: 試薬キットおよびサンプルタイプ毎に用意されている推奨プロトコル(英語版)をご確認ください。各種プロトコルは下記のウェブページよりご覧になれます。
<https://acdbio.com/documents/product-documents>

手順の確認: RNAScope™の実験手順を動画で解説しています。実験の様子や流れを事前にご確認ください。
<https://www.cosmobio.co.jp/support/technology/rnascope/rnascope-videos-adc.asp>

製品の詳細はこちら

QRコードから
日本語クイックガイドや
実験動画をご覧になれます。



<https://www.cosmobio.co.jp/s/002/>

* 染色工程には推奨プロトコル(英語版)と異なる部分がございますが、アッセイ結果に影響はございません。

任意	必要品/便利品	備考
<input type="checkbox"/>	染色バット	染色枚数が少ない場合は
<input type="checkbox"/>	スライドガラス用ラック	メーラー (5枚入) でも可
<input type="checkbox"/>	エタノール	Freshなものを用意
<input type="checkbox"/>	キシレン	Freshなものを用意
<input type="checkbox"/>	蒸留水や超純水	Freshなものを用意
<input type="checkbox"/>	温度計	賦活化液ポイル温度を測定する
<input type="checkbox"/>	マイクロピペット	試薬分注・滴下
<input type="checkbox"/>	マイクロピペットのチップ	試薬分注・滴下
<input type="checkbox"/>	乾燥機	切片乾燥、ハイキングなど
<input type="checkbox"/>	ドライヤー	切片乾燥
<input type="checkbox"/>	パラフィルム	切片上で試薬が広がりにくい時に
<input type="checkbox"/>	固定液	10%NBF or 4%PFA/PBS 新鮮なものを用意

任意	必要品/便利品	備考
<input type="checkbox"/>	アルミ箔/サララップ等	賦活化液ポイル時の蒸発を防ぐ
<input type="checkbox"/>	500ml ビーカー	試薬調製
<input type="checkbox"/>	1~2L メスシリンダー	試薬調製
<input type="checkbox"/>	ピンセット (大)	ポイル時のスライドラック取り扱い
<input type="checkbox"/>	ピンセット (小)	パラフィルムやカバーガラスの取り扱い
<input type="checkbox"/>	キムタオル/キムワイブ	スライドガラス上の余分な水分を取るため
<input type="checkbox"/>	綿棒	
<input type="checkbox"/>	50ml 遠沈管	試薬原液分注用
<input type="checkbox"/>	1.5 ml チューブ	発色液調製
<input type="checkbox"/>	1~3L ボトル	wash buffer 保存用
<input type="checkbox"/>	カバーガラス	
<input type="checkbox"/>	Gill'sヘマトキシリン	Gillを推奨
<input type="checkbox"/>	アンモニア	色出し、ブルーイング (青味を出すため)

新鮮凍結 (Fresh Frozen) サンプル 前処理

任意	✓	ステップ	時間	回数	温度	試薬	メモ	装置・器具
	<input type="checkbox"/>	解剖と摘出	~5分					染色バット、金属ラック等
	<input type="checkbox"/>	氷上で 厚さ5mm以下にcut			on ice		包埋で利用するモールドをドライアイスの温度に10分間平衡化させる	シャーレ、モールド
	<input type="checkbox"/>	OCT包埋	5分		on dry ice	Dry Ice & OCT	組織の余分な水分をペーパーで除きドライアイス上のモールドの中でOCTに包埋する	発泡スチロールボックス
	<input type="checkbox"/>	薄切			-15~-20℃		推奨は10-20um OCTブロックは少なくとも1時間前に-80℃から出しCryostat内部の温度に慣らしておく	Cryostat, microtome
	<input type="checkbox"/>	乾燥	1-2時間		-20℃		薄切後のスライドガラスはcryostatの中で乾燥	Cryostat
	<input type="checkbox"/>	ストップポイント	~3か月		-80℃		乾燥後の薄切スライドは-80℃で3か月保存可能	
	<input type="checkbox"/>	固定	1時間		4℃	10%NBF又は4%PFA/PBS	-80℃から取り出したスライドガラスを素早く固定液に入れる	
	<input type="checkbox"/>	洗浄		x1		PBS		
	<input type="checkbox"/>	50%エタノール	5分		室温	50%エタノール		染色バット、金属ラック等
	<input type="checkbox"/>	70%エタノール	5分		室温	70%エタノール	部分的に剥がれてたり切片にしわが寄っていないか確認 試薬は新しいものを使用する	
	<input type="checkbox"/>	100% エタノール	5分	x2	室温	100% エタノール		
	<input type="checkbox"/>	ストップポイント	~1週間		-20℃	100% エタノール	長引くとRNAが分解する恐れあり	
	<input type="checkbox"/>	乾燥	5分		室温		切片の剥離防止に有効	
	<input type="checkbox"/>	ハイキング	~30分		60℃		切片の剥離防止に有効	ハイブリオープン/ 乾燥機等
	<input type="checkbox"/>	疎水バリア作成	5分		室温	ImmEdge Hydrophobic Barrier Pen	指定のペン以外ではインクが溶けやすい	
	<input type="checkbox"/>	過酸化水素 (H2O2)	10分		室温	Hydrogen Peroxide	内源性ペルオキシダーゼ (POD) の失活 H2O2が切片上で拡がりにくい可能性がある	マイクロピペットのチップ/ カバーガラス/パラフィルム等
	<input type="checkbox"/>	洗浄	上下3-5回	x2	室温	蒸留水~超純水		染色バット、金属ラック等
	<input type="checkbox"/>	プロテアーゼ処理	30分		室温	Protease IV	<条件検討: 反応時間、温度、プロテアーゼの種類> 並行してプローブのプレヒート (40℃, 15分)	プロテアーゼを広げにくい時→ マイクロピペットのチップ/ カバーガラス/パラフィルム等
	<input type="checkbox"/>	洗浄	上下3-5回	x2	室温	蒸留水~超純水	切片の剥離やダメージの程度を確認	
	<input type="checkbox"/>	ハイブリダイゼーション	2時間		40℃	各プローブ	洗浄バッファー作成 蒸留水や超純水で50倍希釈 希釈前に析出の有無を確認、数カ月保存可能	ハイブリオープン バッファー保存のためのボトル、 1~2Lメスシリンダー、デイスポの 50ml遠沈管やピペット等
	<input type="checkbox"/>	洗浄	2分		室温	1 x wash buffer		
	<input type="checkbox"/>	ストップポイント	O/N		室温	5xSSC	20X SSC (saline Sodium Citrate)バッファー 蒸留水もしくは超純水800mlに NaCl: 175.3 g + クエン酸ナトリウム: 88.2 g ⇒1M HClで滴下してpH 7.0に調製 ⇒水で1 Lまでメスアップ ⇒オートクレーブで滅菌	染色バット、金属ラック等
						↑	BaseScope試薬	

✓	ステップ	時間	回数	温度	試薬	メモ	装置・器具	
□	洗浄	2分		室温	1×wash buffer	洗浄後、洗浄液をしっかりと除く 乾燥・剥離に注意	【スライド洗浄】 染色バットと金属ラック 【洗浄液を吸い取る】 綿棒、キムタオルやキムワイブ等 【試薬反応温度維持】 ハイブリオープン	
□	AMP1	30分		40℃	AMP1			
□	洗浄	2分	×2	室温	1×wash buffer	洗浄後、洗浄液をしっかりと除く 乾燥・剥離に注意		
□	AMP2	30分		40℃	AMP2			
□	洗浄	2分	×2	室温	1×wash buffer	洗浄後、洗浄液をしっかりと除く 乾燥・剥離に注意		
□	AMP3	15分		40℃	AMP3			
□	洗浄	2分	×2	室温	1×wash buffer	洗浄後、洗浄液をしっかりと除く 乾燥・剥離に注意		
□	AMP4	30分		40℃	AMP4			
□	洗浄	2分	×2	室温	1×wash buffer	洗浄後、洗浄液をしっかりと除く 乾燥・剥離に注意		
□	AMP5	30分		40℃	AMP5			
□	洗浄	2分	×2	室温	1×wash buffer	洗浄後、洗浄液をしっかりと除く 乾燥・剥離に注意		
□	AMP6	15分		40℃	AMP6			
□	洗浄	2分	×2	室温	1×wash buffer	洗浄後、洗浄液をしっかりと除く 乾燥・剥離に注意		
□	AMP7	30分		室温	AMP7	反応時間を延長するとシグナル増強 <条件検討：反応時間>		
□	洗浄	2分	×2	室温	1×wash buffer	洗浄後、洗浄液をしっかりと除く 乾燥・剥離に注意		
□	AMP8	15分		室温	AMP8			
□	洗浄	2分	×2	室温	1×wash buffer	洗浄後、洗浄液をしっかりと除く 乾燥・剥離に注意		
□	Fast Red	10分		室温	Fast Red-A Fast Red-B	基質液調整 (RED-A : RED-B = 60:1) 混合後は3-5分以内に使用する	マイクロピペット、1.5mlチューブ、 チューブラック等	
□	洗浄	2分		室温	1×wash buffer	洗浄後、洗浄液をしっかりと除く 乾燥・剥離に注意	【スライド洗浄】 染色バットと金属ラック 【洗浄液を吸い取る】 綿棒、キムタオルやキムワイブ等 【試薬反応温度維持】 ハイブリオープン	
□	AMP9	15分		40℃	AMP9			
□	洗浄	2分	×2	室温	1×wash buffer	洗浄後、洗浄液をしっかりと除く 乾燥・剥離に注意		
□	AMP10	15分		40℃	AMP10			
□	洗浄	2分	×2	室温	1×wash buffer	洗浄後、洗浄液をしっかりと除く 乾燥・剥離に注意		
□	AMP11	30分		室温	AMP9			
□	洗浄	2分	×2	室温	1×wash buffer	洗浄後、洗浄液をしっかりと除く 乾燥・剥離に注意		
□	AMP12	15分		室温	AMP10			
□	洗浄	2分	×2	室温	1×wash buffer	洗浄後、洗浄液をしっかりと除く 乾燥・剥離に注意		
□	GREEN	10分		室温	Green-A Green-B	基質液調整 (Green-A : Green-B = 50:1)		マイクロピペット、1.5mlチューブ、 チューブラック等
□	洗浄	5分		室温	1×wash buffer	洗浄後、洗浄液をしっかりと除く 乾燥・剥離に注意		
□	対比染色	~30秒		室温	50% Gillの ヘマトキシリン	視野が明るく観察しやすいためGillを推奨		染色バット、金属ラック ※ヘマトキシリンが落ちにくいので 専用のものを用意するとよい
□	アンモニア水			室温	0.02% アンモニア	青味を出すため (bluing)、炭酸リチウムも可		
□	洗浄			室温	水道水	流水で洗浄		
□	乾燥	15~ 30分		60℃		エタノール脱水の代わり Fast Redがエタノールに、Greenが水に可溶	乾燥機、オープン	
□	風乾	5分		室温				
□	キシレン	~2秒		室温	キシレン	封入剤をなじませるため 一瞬だけつけるもしくははたらす	染色バット、金属ラック	
□	封入			室温	Vectamount		マイクロピペット、カバーガラス、 キムタオル、マッペ等	