

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コードからも
 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	新しいものを用意
	<input type="checkbox"/>	キシレン	新しいものを用意
	<input type="checkbox"/>	蒸留水や超純水	新しいものを用意
	<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、ペイキングなど
>	<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

任意	✓	必要品/便利品	備考
	<input type="checkbox"/>	1~2L メスシリンダー	試薬調整
>	<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"/>	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)

接着培養細胞 (Cultured cell) 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"/>	前日に細胞をまく				培養液	翌日細胞を固定する時点で コンフルエントが80-90%になるように	チャンバースライド (Fisher Scientific cat#08-774-25)
	<input type="checkbox"/>	チャンバーを外し洗浄			室温	PBS	乾燥を避けしっかり細胞が浸かる量で洗浄	
	<input type="checkbox"/>	固定	30分		室温	10%NBF 又は 4%PFA/PBS		
	<input type="checkbox"/>	洗浄	1分	×2	室温	PBS		
	<input type="checkbox"/>	50%エタノール	5分		室温	50%エタノール		
	<input type="checkbox"/>	70%エタノール	5分		室温	70%エタノール	試薬は新しいものを使用する	染色バット、金属ラック等
	<input type="checkbox"/>	100% エタノール	5分		室温	100% エタノール		
	<input type="checkbox"/>	100% エタノール	10分		室温	100% エタノール		
>	<input type="checkbox"/>	ストップポイント	~6カ月		-20℃	100% エタノール	~6カ月	
	<input type="checkbox"/>	70%エタノール	2分		室温	70%エタノール		
	<input type="checkbox"/>	50%エタノール	2分		室温	50%エタノール		
	<input type="checkbox"/>	洗浄	10分		室温	PBS		
	<input type="checkbox"/>	過酸化水素 (H2O2)	10分		室温	Hydrogen Peroxide	内在性ペルオキシダーゼ (POD) 失活 H2O2が切片上で広がりにくい可能性がある	H2O2を拡げにくいとき、 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	1分	×2	室温	PBS		染色バット、金属ラック等
	<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 細胞が乾燥しない様に注意	
	<input type="checkbox"/>	プロテアーゼ処理	10分		室温	Protease III (多くのセルラインには PBSで15倍希釈)	<条件検討: proteaseの希釈濃度> 並行してプローブのプレヒート (40℃、15分)	プロテアーゼを拡げにくいとき、 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	1分	×2	室温	PBS	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℃	プローブ液		
	<input type="checkbox"/>	洗浄	2分		室温	1 x wash buffer	蒸留水や超純水で50倍希釈 希釈前に析出の有無を確認、作り置き可能	
>	<input type="checkbox"/>	ストップポイント	0/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 x 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	x2	室温	1 x 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	x2	室温	1 x 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	x2	室温	1 x 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	x2	室温	1 x 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	x2	室温	1 x 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	x2	室温	1 x 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	x2	室温	1 x 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	x2	室温	1 x 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 x 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	x2	室温	1 x 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	x2	室温	1 x 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	x2	室温	1 x 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	x2	室温	1 x wash buffer	洗浄後、洗浄液をしっかりと除く 乾燥・剥離に注意	マイクロピペット、1.5mlチューブ、 チューブラック等
□	GREEN	10分		室温	Green-A Green-B	基質液調整 (Green-A : Green-B = 50:1)	
□	洗浄	5分		室温	1 x 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
□	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	水道水	流水で洗浄	
□	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、マッパ等