

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 | 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 | 賦活化液沸点温度を測定する |
| <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、ヘイキングなど |
| <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/サランラップ等 | 賦活化液ポイル時の液の蒸発を防ぐ |
| <input type="checkbox"/> | 500ml ビーカー | 試薬調整 |
| <input type="checkbox"/> | 1~2L メスシリンダー | 試薬調整 |
| <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 | 発色液調整 |
| <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 (再味を出すため) |

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"/> | <input type="checkbox"/> | 解剖と摘出 | ~5分 | | | | | 染色バット、金属ラック等 |
| <input type="checkbox"/> | <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"/> | <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"/> | <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"/> | <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"/> | <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"/> | <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"/> | <input type="checkbox"/> | 洗浄 | | ×1 | | PBS | | 染色バット、金属ラック等 |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | 50%エタノール | 5分 | | 室温 | 50%エタノール | | |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | 70%エタノール | 5分 | | 室温 | 70%エタノール | 部分的に剥がれてい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"/> | <input type="checkbox"/> | 100%エタノール | 5分 | ×2 | 室温 | 100%エタノール | | |
| <input type="checkbox"/> | <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"/> | <input type="checkbox"/> | 乾燥 | 5分 | | 室温 | | 切片の剥離防止に有効 | |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | ヘイキング | ~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"/> | <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"/> | <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) 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"/> | <input type="checkbox"/> | 洗浄 | 上下3-5回 | ×2 | 室温 | 蒸留水~超純水 | | 染色バット、金属ラック等 |
| <input type="checkbox"/> | <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"/> | <input type="checkbox"/> | 洗浄 | 上下3-5回 | ×2 | 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"/> | <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"/> | <input type="checkbox"/> | 洗浄 | 2分 | | 室温 | 1×wash buffer | | |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | ストップポイント | O/N | | 室温 | 5×SSC | 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に調整 ⇒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 |
| | | | | | | ↑ | | miRNAscope試薬 |

miRNAscope™ RED

| ✓ | 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 |
| □ | AMP1 | 30分 | | 40℃ | AMP1 | | 【洗浄液を吸い取る】 綿棒、キムタオルやキムワイブ等 |
| □ | 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 | 【試薬反応温度維持】 ハイブリオープン |
| □ | AMP2 | 15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 | 30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 | 15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 | | 室温 | AMP5 | 室温、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 | |
| □ | AMP6 | 15分 | | 室温 | 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 | |
| □ | 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 | | | 室温 | 蒸留水~超純水 | 流水で洗浄 | |
| □ | 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 |
| □ | 洗浄 | | | 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 | アルカリで青味を出すため (bluing)、炭酸リチウムも可、 Fast Redの染まりが悪い時はスキップ | |
| □ | 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がエタノールに溶けてしまうため | 乾燥機、オープン |
| □ | 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たらず | 染色バット、金属ラック |
| □ | 封入 | | | 室温 | EcoMount / Vectamount | | マイクロピペット、カバーガラス、 キムタオル、マッペ等 |



人と科学のステキな未来へ

コスモ・バイオ株式会社

商品に関するお問い合わせ
TEL: 080-7372-3503 担当: 平林
EMAIL: acd_japan@bio-techne.com

— 商品に関するお問い合わせ —
TEL: 03-5632-9610 (受付時間 9:00 ~ 17:30)
FAX: 03-5632-9619

本社所在地 〒135-0016 東京都江東区東陽 2-2-20 東陽駅前ビル