

## 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>

\* 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。

### 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/>



| 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<br>メーラー (5枚入) でも可 |
|    | <input type="checkbox"/> | スライドガラス用ラック   |                               |
|    | <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"/> | 温度計           | 100℃前後の測定が可能なものを推奨            |
|    | <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"/> | スチーマー/オイルバス   | 賦活化液を沸騰させる為                   |
|    | <input type="checkbox"/> | ／ヒーター付きスターラー等 | ライドガラスを入れることができればなんでもよい       |

| 任意 | ✓                        | 必要品/便利品        | 備考                   |
|----|--------------------------|----------------|----------------------|
|    | <input type="checkbox"/> | アルミ箔/サランラップ等   | 賦活化液ボイル時の蒸発を防ぐ       |
|    | <input type="checkbox"/> | 500ml ビーカー     | ヒーターの上で賦活化液をボイルする為   |
|    | <input type="checkbox"/> | 電子レンジ          | 賦活化液の余熱に利用           |
| >  | <input type="checkbox"/> | ピンセット (大)      | ボ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"/> | 50ml 遠沈管       | 試薬原液分注用              |
| >  | <input type="checkbox"/> | 1.5 ml チューブ    | 染色液調製                |
| >  | <input type="checkbox"/> | メスシリンダー        | 試薬調製                 |
| >  | <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's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) |

### 固定凍結 (Fixed Frozen)

| 任意 | ✓                        | ステップ         | 時間     | 回数 | 温度               | 試薬                                                                | メモ                                                                                                                                                    | 装置・器具                                                                                |
|----|--------------------------|--------------|--------|----|------------------|-------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
|    | <input type="checkbox"/> | (灌流) 固定      | 24時間   |    | 4℃               | 10%NBF又は<br>4%PFA/PBS                                             | 必要であれば灌流固定                                                                                                                                            |                                                                                      |
|    | <input type="checkbox"/> | sucrose置換    | 18時間   |    | 4℃               | 10%Sucrose/PBS                                                    | ↑24時間の固定が長いと思う様であれば4℃ O/N固定後<br>10% Sucrose/4% PFA/PBSで沈むまで置換も可                                                                                       |                                                                                      |
|    | <input type="checkbox"/> |              | 沈むまで   |    | 4℃               | 20% Sucrose/PBS                                                   |                                                                                                                                                       |                                                                                      |
|    | <input type="checkbox"/> |              | 沈むまで   |    | 4℃               | 30% Sucrose/PBS                                                   |                                                                                                                                                       |                                                                                      |
|    | <input type="checkbox"/> | OCT包埋と凍結     | 5分     |    | on<br>dry<br>ice | Dry Ice & OCT                                                     | 組織の余分な水分をペーパーで除き<br>ドライアイス上のモールドの中でOCTに包埋する<br>ブロックを-80℃で保存可能                                                                                         | 発泡スチロールボックス                                                                          |
|    | <input type="checkbox"/> | 薄切           |        |    | -15～<br>-20℃     |                                                                   | 推奨は7-15um<br>OCTブロックは少なくとも1時間前に-80℃から出し<br>Cryostat内部の温度に慣らせておく                                                                                       | 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"/> | 洗浄           | 5分     |    | 室温               | PBS                                                               | ラックを上下に動かしOCTを洗い流す                                                                                                                                    | 染色バット、金属ラック等                                                                         |
|    | <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"/> | 後固定          | 1時間    |    | 室温               | 10%NBF又は<br>4%PFA/PBS                                             | この後細胞内部が各試薬に暴露される為再固定する                                                                                                                               |                                                                                      |
|    | <input type="checkbox"/> | 50%エタノール     | 5分     |    | 室温               | 50%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<br>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"/> | 70%エタノール     | 5分     |    | 室温               | 70%エタノール                                                          |                                                                                                                                                       |                                                                                      |
|    | <input type="checkbox"/> | 100% エタノール   | 5分     | x2 | 室温               | 100% エタノール                                                        |                                                                                                                                                       |                                                                                      |
|    | <input type="checkbox"/> | 乾燥           | 5分     |    | 室温               |                                                                   | 切片の剥離防止に有効                                                                                                                                            |                                                                                      |
| >  | <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"/> | 過酸化水素 (H2O2) | 10分    |    | 室温               | Hydrogen<br>Peroxide                                              | 内在性ペルオキシダーゼ (POD) の失活<br>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/<br>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"/> | 賦活化液によるボイル   | 5分     |    | 98～<br>102℃      | 1X Target<br>Retrieval Buffer                                     | 一旦温度が下がるので、<br>再度温度が上がってから時間を測る事<br>目安: 500mlビーカーでボイル⇒350ml準備<br><条件検討：反応時間>                                                                          | スチーマー/オイルバス/<br>ヒーター付きスターラー等<br>アルミ箔/サランラップ等、<br>500mlビーカー、温度計、ピンセット                 |
|    | <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"/> | 100% エタノール   | 3分     |    | 室温               | 100% エタノール                                                        | 脱水                                                                                                                                                    |                                                                                      |
|    | <input type="checkbox"/> | 乾燥           | 5分     |    | 室温               |                                                                   | 室温でドライヤーなど、任意の方法で                                                                                                                                     |                                                                                      |
| >  | <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"/> | 疎水バリア作成      | 5分     |    | 室温               | ImmEdge<br>Hydrophobic<br>Barrier Pen                             | 指定のペン以外ではインクが溶けやすい                                                                                                                                    |                                                                                      |
| >  | <input type="checkbox"/> | ストップポイント     | ～O/N   |    | 室温               |                                                                   | インクが乾くまで～オーバーナイト (O/N)                                                                                                                                |                                                                                      |
|    | <input type="checkbox"/> | プロテアーゼ処理     | ～30分   |    | 40℃              | Protease Plus<br>(発色キット)<br>Protease III<br>(蛍光キット,<br>BaseScope) | <条件検討：反応時間、温度、プロテアーゼの種類><br>並行してフロープのプレヒート (40℃、15分)                                                                                                  | ハイブリオープン、専用トレイ、<br>専用スライドホルダー<br>※プロテアーゼを拡げにくいとき、<br>マイクロピペットのチップ/<br>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"/> | ハイブリタイゼーション  | 2時間    |    | 40℃              | 各フロープ                                                             | 洗浄バッファー作成<br>蒸留水や超純水で50倍希釈<br>希釈前に析出の有無を確認、数か月保存可能                                                                                                    | ハイブリオープン<br>バッファー保存のためのボトル、<br>1～2Lメスシリンダー、<br>デイスボの50ml遠沈管やピペット等                    |
|    | <input type="checkbox"/> | 洗浄           | 2分     |    | 室温               | 1×wash buffer                                                     |                                                                                                                                                       |                                                                                      |
| >  | <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<br>蒸留水もしくは超純水800mlに<br>NaCl: 175.3 g+クエン酸ナトリウム: 88.2 g<br>⇒1M HClで滴下してpH 7.0に調整<br>⇒水で1 Lまでメスアップ<br>⇒オートクレーブで滅菌 | 染色バット、金属ラック等                                                                         |
|    |                          |              |        |    |                  | ↑                                                                 | RNAscope試薬                                                                                                                                            |                                                                                      |

| RNAScope™ 2.5 HD Duplex |          |            |    |     |                          |                                           |                                 |
|-------------------------|----------|------------|----|-----|--------------------------|-------------------------------------------|---------------------------------|
| ✓                       | 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<br>乾燥・剥離に注意               | 【スライド洗浄】<br>染色バットと金属ラック         |
| □                       | 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<br>乾燥・剥離に注意               |                                 |
| □                       | AMP2     | 15分        |    | 40℃ | AMP2                     |                                           | 【洗浄液を吸い取る】<br>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<br>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<br>乾燥・剥離に注意               | 【試薬反応温度維持】<br>ハイブリオープン          |
| □                       | 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<br>乾燥・剥離に注意               |                                 |
| □                       | AMP5     | 30分        |    | 室温  | AMP5                     | 反応時間を延長するとシグナル増強<br>＜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<br>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<br>乾燥・剥離に注意               |                                 |
| □                       | Fast Red | 10分        |    | 室温  | Fast Red-A<br>Fast Red-B | 基質液調整（RED-A : RED-B = 60:1）               |                                 |
| □                       | 洗浄       | 2分         |    | 室温  | 1 × wash buffer          | 洗浄後、洗浄液をしっかりと除く<br>乾燥・剥離に注意               |                                 |
| □                       | AMP7     | 15分        |    | 40℃ | AMP7                     |                                           | 【スライド洗浄】<br>染色バットと金属ラック         |
| □                       | 洗浄       | 2分         | ×2 | 室温  | 1 × wash buffer          | 洗浄後、洗浄液をしっかりと除く<br>乾燥・剥離に注意               |                                 |
| □                       | AMP8     | 30分        |    | 40℃ | 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<br>乾燥・剥離に注意               | 【洗浄液を吸い取る】<br>綿棒、キムタオルやキムワイブ等   |
| □                       | AMP9     | 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<br>乾燥・剥離に注意               |                                 |
| □                       | AMP10    | 15分        |    | 室温  | AMP10                    |                                           | 【試薬反応温度維持】<br>ハイブリオープン          |
| □                       | 洗浄       | 2分         | ×2 | 室温  | 1 × wash buffer          | 洗浄後、洗浄液をしっかりと除く<br>乾燥・剥離に注意               |                                 |
| □                       | GREEN    | 10分        |    | 室温  | Green-A<br>Green-B       | 基質液調整（Green-A : Green-B = 50:1）           |                                 |
| □                       | 洗浄       | 5分         |    | 室温  | 1 × wash buffer          | 洗浄後、洗浄液をしっかりと除く<br>乾燥・剥離に注意               | マイクロピペット、<br>1.5mlチューブ、チューブラック等 |
| □                       | 対比染色     | ～30秒       |    | 室温  | 50% Gillの<br>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                     | 【スライド洗浄】<br>染色バットと金属ラック         |
| □                       | 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              | 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                                     | 乾燥機、オープン                        |
| □                       | 乾燥       | 15～<br>30分 |    | 60℃ |                          | エタノール脱水の代わり<br>Fast Redがエタノールに、Greenが水に可溶 |                                 |
| □                       | 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<br>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               |                                           |                                 |