

RNAScope™ 2.5 HD Duplex クイックガイド (for fresh frozen tissue)

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
	☐	染色バット	染色枚数が少ない場合は
	☐	スライドガラス用ラック	メーラー（5枚入）でも可
	☐	エタノール	Freshなものを用意
	☐	キシレン	Freshなものを用意
	☐	蒸留水や超純水	Freshなものを用意
	☐	温度計	賦活化液ボイル温度を測定する
	☐	マイクロピペット	試薬分注・滴下
	☐	マイクロピペットのチップ	試薬分注・滴下
	☐	乾燥機	切片乾燥、ヘイキングなど
	☐	ドライヤー	切片乾燥
	☐	パラフィルム	切片上で試薬が広がりにくい時に
	☐	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
	☐	アルミ箔／サランラップ等	賦活化液ボイル時の液の蒸発を防ぐ
	☐	500ml ビーカー	試薬調製
	☐	1～2L メスシリンダー	試薬調製
	☐	ピンセット（大）	ボイル時のスライドラック取り扱い
	☐	ピンセット（小）	パラフィルムやカバーガラスの取り扱い
	☐	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
	☐	綿棒	
	☐	50ml 遠沈管	試薬原液分注用
	☐	1.5 ml チューブ	発色液調製
	☐	1～3L ボトル	wash buffer 保存用
	☐	カバーガラス	
	☐	Gill's ヘマトキシリン	Gillを推奨
	☐	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
	☐	解剖と摘出	～5分					染色バット、金属ラック等
	☐	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
	☐	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
	☐	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
	☐	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
	☐	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	
	☐	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	
	☐	洗浄		×1		PBS		染色バット、金属ラック等
	☐	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 試薬は新しいものを使用する	
	☐	70%エタノール	5分		室温	70%エタノール		
	☐	100% エタノール	5分	×2	室温	100% エタノール		
	☐	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	
	☐	乾燥	5分		室温		切片の剥離防止に有効	
	☐	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
	☐	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	
	☐	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
	☐	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
	☐	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> 並行してブ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
	☐	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	
	☐	ハイブリダイゼーション	2時間		40℃	各ブローブ	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
	☐	洗浄	2分		室温	1×wash buffer		
	☐	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
	☐					↑	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 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プ等 【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	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	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	
シグナル増幅	Fast Red	10分		室温	Fast Red-A Fast Red-B	基質液調整 (RED-A : RED-B = 60:1)	マイクロピペット、1.5mlチューブ、 チューブラック等
	洗浄	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プ等 【試薬反応温度維持】 ハイブリオープン
	AMP7	15分		40℃	AMP7		
	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	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 乾燥・剥離に注意	
	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 乾燥・剥離に注意	
	AMP10	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
対比染色	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	【スライド洗浄】 染色バットと金属ラック 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
	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	
	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	
脱水・透徹	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たらす	染色バット、金属ラック
封入	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