

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/>



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 メーラー（5枚入）でも可
	☐	スライドガラス用ラック	
	☐	エタノール	新しいものを用意
	☐	キシレン	新しいものを用意
	☐	蒸留水や超純水	新しいものを用意
	☐	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、バッキングなど
	☐	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

任意	✓	必要品／便利品	備考
	☐	1～2L メスシリンダー	試薬調整
	☐	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/キムワイプ	スライドガラス上の余分な水分を取るため
	☐	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）

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
	☐	培養	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)
	☐		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
	☐	固定・脱水	固定	30分		室温	10%NBF 又は 4%PFA/PBS	試薬は新しいものを使用する	染色バット、金属ラック等
	☐		洗浄	1分	×2	室温	PBS		
	☐		50%エタノール	5分		室温	50%エタノール		
	☐		70%エタノール	5分		室温	70%エタノール		
	☐		100% エタノール	5分		室温	100% エタノール		
	☐		100% エタノール	10分		室温	100% エタノール		
Y	☐		ストップポイント	~6カ月		-20℃	100% エタノール		
	☐	再水和	70%エタノール	2分		室温	70%エタノール		
	☐		50%エタノール	2分		室温	50%エタノール		
	☐		洗浄	10分		室温	PBS		
	☐	POD失活	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が切片上で拡がりにくい可能性がある	H2O2を拡げるににくいとき、 マイクロビペットのチップ/ カバーガラス/パラフィルム等
	☐		洗浄	1分	×2	室温	PBS		染色バット、金属ラック等
	☐	細胞透過処理	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	
	☐		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> 並行してブローブのプレヒート (40℃、15分)	プロテアーゼを拡げににくいとき、 マイクロビペットのチップ/ カバーガラス/パラフィルム等
	☐		洗浄	1分	×2	室温	PBS	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	ハイブリダイゼーション	2時間		40℃	ブローブ液		
	☐		洗浄	2分		室温	1 ×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	
Y	☐		ストップポイント	O/N		室温	5×SSC	<u>20X SSC (saline Sodium Citrate)バッファー</u> 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		
シグナル増幅	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	マイクロピペット、1.5mlチューブ、 チューブラック等
	Fast Red	10分		室温	Fast Red-A 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 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
	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	【試薬反応温度維持】 ハイブリオープン
	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	マイクロピペット、1.5mlチューブ、 チューブラック等
	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 乾燥・剥離に注意	
	AMP10	15分		室温	AMP10		
対比染色	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	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
	GREEN	10分		室温	Green-A Green-B	基質液調整 (Green-A : Green-B = 50:1)	
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	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	
脱水・遠徴	洗浄			室温	水道水	流水で洗浄	乾燥機、オープン
	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	
	風乾	5分		室温			
封入	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 マイクロピペット、カバーガラス、 キムタオル、マッペ等
	封入			室温	Vectamount		