RNAscope® Fluorescent Multiplex Reagent 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 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	
	□	蒸留水や超純水	
	□	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、ベイキングなど
➢	□	ドライヤー	切片乾燥

任意	✓	必要品／便利品	備考
➢	□	パラフィルム	切片上で試薬が広がりにくい時に
	□	1～2L　メスシリンダー	試薬調製
➢	□	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	スライドガラス上の余分な水分を取るため
➢	□	キムワイプ	
➢	□	綿棒	
➢	□	50ml 遠沈管	試薬原液分注用
➢	□	1～3L　ボトル	wash bufffer　保存用
	□	カバーガラス	

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
	□	固定	準備	1時間		**4℃**	新鮮な10%NBF又は 新鮮な4%PFA/PBS	試薬を作成し十分に冷やしておく	染色バット、金属ラック等
	□		**固定**	**15分**		**4℃**		-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	染色バット、金属ラック等
			洗浄		**×2**		PBS		
	□	脱水	**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	
	□		**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	
	□	細胞透過処理	**疎水バリア作製**	**~1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	
	□		**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>** 並行して**プローブのプレヒート（40℃、10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
	□		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℃**	各プローブ		【試薬反応温度維持】 ハイブリオーブン
	□		洗浄	2分		室温	1 ×wash buffer	洗浄バッファー作製 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	ハイブリオーブン 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
➢	□		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® Fluorescent Multiplex

✓		ステップ	時間	回数	温度	試薬	メモ	装置・器具
□	シグナル増幅	洗浄	2分		室温	1 ×wash buffer	洗浄後、洗浄液をしっかり除く 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】 ハイブリオーブン
□		**AMP1**	**30分**		**40℃**	AMP1-FL		
□		洗浄	2分	×2	室温	1 ×wash buffer	洗浄後、洗浄液をしっかり除く 乾燥・剥離に注意	
□		**AMP2**	**15分**		**40℃**	AMP2-FL		
□		洗浄	2分	×2	室温	1 ×wash buffer	洗浄後、洗浄液をしっかり除く 乾燥・剥離に注意	
□		**AMP3**	**30分**		**40℃**	AMP3-FL		
□		洗浄	2分	×2	室温	1 ×wash buffer	洗浄後、洗浄液をしっかり除く 乾燥・剥離に注意	
□	発色	**AMP4**	**15分**		**40℃**	AMP4-FL	Alt A、Alt B又はAlt Cのいずれかを選択して使用	
□		洗浄	2分	×2	室温	1 ×wash buffer	洗浄後、洗浄液をしっかり除く 乾燥・剥離に注意	
□	核染・封入	**DAPI**				DAPI	DAPI入り封入剤をお使いの場合はスキップ	
□		**封入**				蛍光退色防止剤入の水溶性封入剤	推奨：ProLong™ Gold Antifade Mountant （ cat#P36930 ）	マイクロピペット、カバーガラス、キムタオル、マッペ等

	Amp 4 Alt A-FL	Amp 4 Alt B-FL	Amp 4 Alt B-FL
C1	Alexa 488	Atto 550	Atto 550
C2	Atto 550	Alexa 488	Atto 647
C3	Atto 647	Atto 647	Alexa 488

a bio-techne brand

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

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: 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