

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
		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	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
		温度計	100℃前後の測定が可能なものを用意
		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、ベイクングなど
		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
		スチーマー/オイルバス	賦活化液を沸騰させる為
		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
		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	ヒーターの上で賦活化液をボイルする為
		電子レンジ	賦活化液の余熱に利用
		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
		50ml 遠沈管	試薬原液分注用
		1.5 ml チューブ	発色液調製
		メスシリンダー	試薬調製
		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 (再味を出すため)

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
		(濯流) 固定	24時間		4℃	10%NBF又は 4%PFA/PBS	必要であれば濯流固定	
		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 10% Sucrose/4% PFA/PBSで沈むまで置換も可	
			沈むまで		4℃	20% Sucrose/PBS		
			沈むまで		4℃	30% Sucrose/PBS		
		OCT包埋と凍結	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 ブロックを-80℃で保存可能	発泡スチロールボックス
		薄切			-15~ -20℃		推奨は7-15um 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	
		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
		ベイクング	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
		後固定	1時間		室温	10%NBF又は 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	
		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	染色バット、金属ラック等
		70%エタノール	5分		室温	70%エタノール		
		100% エタノール	5分	x2	室温	100% エタノール		
		乾燥	5分		室温		切片の剥離防止に有効	
		* ベイクング	~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
		過酸化水素 (H2O2)	10分		室温	Hydrogen Peroxide	内在性ペロキシダーゼ (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	x2	室温	蒸留水~超純水		染色バット、金属ラック等
		賦活化液によるボイル	5分		98~ 102℃	1X Target Retrieval Buffer	一旦温度が下がるので、 再度温度が上がってから時間を測る事 目安: 500mlビーカーでボイル⇒350ml準備 <条件検討: 反応時間>	スチーマー/オイルバス/ ヒーター付きスターラー等
		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	アルミ箔/サランラップ等、500mlビーカー、 温度計、ピンセット
		100% エタノール	3分		室温	100% エタノール	脱水	
		乾燥	5分		室温		室温やドライヤーなど、任意の方法で	
		* ベイクング	~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	
		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)	
		プロテアーゼ処理	~30分		40℃	Protease Plus (発色キット) Protease III (蛍光キット, BaseScope)	<条件検討: 反応時間、温度、プロテアーゼの種類> 並行してプローブのプレヒート (40℃、15分)	ハイブリオープン、専用トレイ、専用スライドホルダー ※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	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	
		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、数か月保存可能	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、 デイスボの50ml遠沈管やピペット等
		洗浄	2分		室温	1 x wash buffer		
		ストップポイント	O/N		室温	5 x 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™ Multiplex Fluorescent v2

✓	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ブ等 【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	30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	15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	
□	HRP-C1	15分		40℃	HRP-C1		
□	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
□	TSA/Opal	30分		40℃	Opal (TSA Vivid)	TSAバッファで、 1:750~2000希釈 して使用 チャネルと蛍光色素の組合わせ自由 Opal690はフィルタの関係でシグナルが弱い可能性有	
□					TSA バッファ		
□	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	
□	HRP blocker	15分		40℃	HRP blocker	洗浄後、洗浄液をしっかりと除く 乾燥・剥離に注意 1色の場合、このあとDAPIへスキップ	
□	洗浄	2分	×2	室温	1×wash buffer		
□	HRP-C2	15分		40℃	HRP-C2		
□	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	
□	TSA/Opal	30分		40℃	Opal (TSA Vivid)	TSAバッファで、 1:750~2000希釈 して使用	
□					TSA バッファ		
□	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	
□	HRP blocker	15分		40℃	HRP blocker	洗浄後、洗浄液をしっかりと除く 乾燥・剥離に注意 2色の場合、このあとDAPIへスキップ	
□	洗浄	2分	×2	室温	1×wash buffer		
□	HRP-C3	15分		40℃	HRP-C3		
□	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
□	TSA/Opal	30分		40℃	Opal (TSA Vivid)	TSAバッファで、 1:750~2000希釈 して使用	
□					TSA バッファ		
□	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	
□	HRP blocker	15分		40℃	HRP blocker	※このステップ以降、HRPを使わなくても行う	
□	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	
□	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 ）	



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-technne.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