

RNAscope® Multiplex Fluorescent Reagents kit V2 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、ベイクングなど
▽	☐	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
▽	☐	キムワイブ	
▽	☐	綿棒	
▽	☐	50ml 遠沈管	試薬原液分注用
▽	☐	1~3L ボトル	wash buffer 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	1時間	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	
	☐		洗浄		×2	PBS		染色バット、金属ラック等
	☐	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	
▽	☐		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
	☐	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	
	☐		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	30秒	×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> 並行してブローブのプレヒート (40℃、10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	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℃	各ブローブ	C2及びC3ブローブ (濃縮状態で提供) をC1ブローブ 液で50倍希釈しブローブ溶液を調整ください。 ※ 4重染色の場合は記事ID：13292をご覧ください。	【試薬反応温度維持】 ハイブリオープン
	☐		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
▽	☐		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に調整 ⇒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	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	
☐	TSA vivid (Opal)	30分		40℃	TSA vivid TSA バッファー	TSA/バッファーで、 1:750~3000希釈 して使用 チャンネルと蛍光色素の組み合わせ自由	マイクロピペット、1.5ml チューブ、チューブブラック等
☐	洗浄	2分	×2	室温	1×wash buffer	洗浄後、洗浄液をしっかりと除く 乾燥・剥離に注意	1色の場合、このあとDAPIへスキップ
☐	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	
☐	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-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 vivid (Opal)	30分		40℃	TSA vivid TSA バッファー	TSA/バッファーで、 1:750~3000希釈 して使用	マイクロピペット、1.5ml チューブ、チューブブラック等
☐	洗浄	2分	×2	室温	1×wash buffer	洗浄後、洗浄液をしっかりと除く 乾燥・剥離に注意	2色の場合、このあとDAPIへスキップ
☐	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	
☐	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-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	
☐	TSA vivid (Opal)	30分		40℃	TSA vivid TSA バッファー	TSA/バッファーで、 1:750~3000希釈 して使用	マイクロピペット、1.5ml チューブ、チューブブラック等
☐	洗浄	2分	×2	室温	1×wash buffer	洗浄後、洗浄液をしっかりと除く 乾燥・剥離に注意	※このステップ以降、HRPを使わなくても行う
☐	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	
☐	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)	マイクロピペット、1.5ml チューブ、チューブブラック等

シングル増幅・染色

核染色・封入



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



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