

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
	☐	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	賦活化液沸点温度を測定する
	☐	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、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
	☐	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	賦活化液沸点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)	沸点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			Dry Ice & OCT		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
	凍結・薄切	OCT包埋	5分		on dry ice		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 Cystostat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			
	☐	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	
	☐	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	
	☐	過酸化水素 (H2O2)	10分		室温	Hydrogen Peroxide	内在性ペルオキシターゼ (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 プ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 x 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™ 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
□	AMP1	30分		40℃	AMP1		【洗浄液を吸い取る】 綿棒、キムタオルやキムワイブ等
□	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	
□	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	【試薬反応温度維持】 ハイブリオープン
□	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/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み合わせ自由 Opal690はフィルタの関係でシグナルが弱い可能性有	マイクロピペット、1.5mlチューブ、 チューブラック等
□					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	
□	洗浄	2分	×2	室温	1×wash buffer	1色の場合、このあとDAPIへスキップ	
□	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	マイクロピペット、1.5mlチューブ、 チューブラック等
□					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	
□	洗浄	2分	×2	室温	1×wash buffer	2色の場合、このあとDAPIへスキップ	
□	HRP-C3	15分		40℃	HRP-C 3		
□	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	マイクロピペット、1.5mlチューブ、 チューブラック等
□					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 ）	マイクロピペット、1.5mlチューブ、 チューブラック等



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-techne.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