## 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 $^{\mathrm{TM}}$ 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。

 $\underline{\text{https://www.cosmobio.co.jp/support/technology/rnascope/rnascope-videos-adc.asp}}$ 

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	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推奨		
	□ マイクロビペット		試薬分注・滴下		
	□ マイクロビペットのチップ		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		
>-	□ 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		

Art site	,	》第日 /原到日	備考				
住息	<b>~</b>	必要品/便利品	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1				
>-		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 販活化液の余熱に利用 ボイル時のスライドラック取り扱い パラフィルムやカバーガラスの取り扱い スライドガラス上の余分な水分を取るため 試集原液分注用 免色液調製 試薬調製				
		電子レンジ					
>-		ピンセット (大)					
>-		ピンセット (小)					
>-		キムタオル/キムワイプ					
>-		50ml 遠沈管					
>		1.5 ml チューブ					
>-		メスシリンダー					
>-		1~3L ボトル	wash bufffer 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)				

## 固定凍結 (Fixed Frozen)

£意	1		ステップ	時間	回数	温度	試薬	定凍結 (Fixed Frozen) メモ	装置・器具	
			(灌流) 固定	24時間		4℃	10%NBF又は	必要であれば灌流固定		
			(准派) 回足	24時間		40	4%PFA/PBS	必安での行は准派回走		
				18時間		4℃	10%Sucurose/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		
			sucurose置換	沈むまで		4℃	20% Sucrose/PBS			
		8		沈むまで		4℃	30% Sucrose/PBS			
		回所・海口	OCT包埋と凍結	5 <del>分</del>		on dry ice	Dry Ice & OCT	組織の余分な水分をベーバーで除き 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 Cyrostat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	
					-	-	. 50			
			ベイキング	30分		60℃		切片の剥離防止に有効	ハイブリオーブン/ 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		
		・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	染色バット、金属ラック等	
		後固定	70%エタノール	5分		室温	70%エタノール	試薬は新しいものを使用する		
		<b>30</b>	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		
>			* ベイキング	~30分		60℃		切片の剥離防止に有効	ハイブリオーブン/ 乾燥機等	
		POD失活	過酸化水素 (H2O2)	10 <del>/)</del>		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	
		2	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	
			賦活化液によるボイル	5分		98~ 102℃	1X Target Retrieval Buffer	ー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 <b>&lt;条件検討:反応時間&gt;</b>	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	×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	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		
>		が描	* ベイキング	~30分		60℃		切片の剥離防止に有効	ハイブリオーブン/ 乾燥機等	
		細胞透過処理	疎水パリア作成	5 <del>分</del>		室温	ImmEdge Hydrophobic Barrier Pen	指定のベ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 <del>分</del>		40℃	Protease Plus (第色キット) Protease III (蛍光キット, BaseScope)	<条件検討:反応時間、温度、プロデアーゼの種類> 並行してプローブのプレヒート (40℃、15分)	ハイブリオーブン、専用トレイ、専用スライドホルダー ※ブロテアーゼを拡げにくいとき、 マイクロビベットのチップ/ カバーガラス/バラフィルム等	
			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	<u>洗浄バッファー作成</u> 蒸留水や超純水で <b>50倍希釈</b>	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	
		u V	洗浄	2分		室温	1×wash buffer	系宙水で起程がで <b>30倍布</b> 状 希釈前に析出の有無を確認、数カ月保存可能	デイスポの50ml遠沈管やピペット等	
<b>-</b>		ハイブリダイゼーシ	ストップポイント	O/N		室温	5×SSC	20X SSC (saline Sodium Citrate)パッファー 素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 HCIで海下して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	
						1	1			

					RN	Ascope™ 2.5 HD BROWN	
	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	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	【洗浄液を吸い取る】 綿棒、キムタオルやキムワイブ等
	AMP2	15分		40℃	AMP2		【試薬反応温度維持】 ハイブリオーブン
	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		
ッグナル増幅	洗浄	2分	×2	室温	1×wash buffer	洗浄後、洗浄液をしっかり除く 乾燥・剥離に注意	
3	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 <b>&lt;条件検討:反応時間&gt;</b>	
	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	
	AMP6	15分		室温	AMP6	1滴の滴下量が他の試薬より多いため、 滴下し過ぎに注意	
	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	
部	DAB	10分		室温	DAB-A、DAB-B	基質液調製( <b>DAB-A:DAB-B = 1:1)</b> DABは発癌性物質なので、グローブ着用	マイクロピペット、1.5mlチューブ、 チューブラック等
DEIN	洗浄			室温	蒸留水~超純水	流水で洗浄	
лET	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	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
対比梁色	洗浄			室温	水道水	流水で洗浄	専用のものを用意するとよい
菽	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・溶衡	洗浄			室温	水道水	流水で洗浄	
	70% エタノール	2分	×2	室温	70% エタノール		
	100% エタノール	2分	×2	室温	100% エタノール	しっかり脱水する	
現	キシレン	5分	×2	室温	キシレン		
封入	封入			室温	EcoMount / Vectamount		マイクロピペット、カバーガラス、 キムタオル、マッペ等



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