

# RNAscope™ 2.5 HD Assay-Brown クイックガイド (for cultured cells)

## 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                            |
|----|--------------------------|--------------|-------------------------------|
|    | <input type="checkbox"/> | 染色バット        | 染色枚数が少ない場合は<br>メーラー (5枚入) でも可 |
|    | <input type="checkbox"/> | スライドガラス用ラック  |                               |
|    | <input type="checkbox"/> | エタノール        | 新しいものを用意                      |
|    | <input type="checkbox"/> | キシレン         | 新しいものを用意                      |
|    | <input type="checkbox"/> | 蒸留水や超純水      | 新しいものを用意                      |
|    | <input type="checkbox"/> | マイクロピペット     | 試薬分注・滴下                       |
|    | <input type="checkbox"/> | マイクロピペットのチップ | 試薬分注・滴下                       |
| ✓  | <input type="checkbox"/> | 乾燥機          | 切片乾燥、ペッキングなど                  |
| ✓  | <input type="checkbox"/> | ドライヤー        | 切片乾燥                          |
| ✓  | <input type="checkbox"/> | パラフィルム       | 切片上で試薬が広がりにくい時に               |

| 任意 | ✓                        | 必要品/便利品        | 備考                   |
|----|--------------------------|----------------|----------------------|
|    | <input type="checkbox"/> | 1~2L メスシリンダー   | 試薬調整                 |
| ✓  | <input type="checkbox"/> | ピンセット (小)      | パラフィルムやカバーガラスの取り扱い   |
| ✓  | <input type="checkbox"/> | 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  |
| ✓  | <input type="checkbox"/> | 50ml 遠沈管       | 試薬原液分注用              |
| ✓  | <input type="checkbox"/> | 1.5 ml チューブ    | 発色液調製                |
| ✓  | <input type="checkbox"/> | 1~3L ボトル       | wash buffer 保存用      |
|    | <input type="checkbox"/> | カバーガラス         |                      |
|    | <input type="checkbox"/> | Gill's ヘマトキシリン | Gillを推奨              |
|    | <input type="checkbox"/> | アンモニア          | 色出し、ブルーイング (青味を出すため) |

### 接着培養細胞 (Cultured cell) 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                                                                                                                                                        |                                                    |
|----|--------------------------|-------------|--------------|------|----|------|-------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
|    | <input type="checkbox"/> | 培養          | 前日に細胞をまく     |      |    | 培養液  | 翌日細胞を固定する時点で<br>コンフルエントが80-90%になるように      | チャンバースライド<br>(Fisher Scientific cat# 08-774-25)                                                                                                              |                                                    |
|    | <input type="checkbox"/> |             | チャンバーを外し洗浄   |      |    | 室温   | PBS                                       | 乾燥を避けしっかり細胞が浸かる量で洗浄                                                                                                                                          | 染色バット、金属ラック等                                       |
|    | <input type="checkbox"/> | 固定・脱水       | 固定           | 30分  |    | 室温   | 10%NBF 又は<br>4%PFA/PBS                    | 試薬は新しいものを使用する                                                                                                                                                |                                                    |
|    | <input type="checkbox"/> |             | 洗浄           | 1分   | ×2 | 室温   | PBS                                       |                                                                                                                                                              |                                                    |
|    | <input type="checkbox"/> |             | 50%エタノール     | 5分   |    | 室温   | 50%エタノール                                  |                                                                                                                                                              |                                                    |
|    | <input type="checkbox"/> |             | 70%エタノール     | 5分   |    | 室温   | 70%エタノール                                  |                                                                                                                                                              |                                                    |
|    | <input type="checkbox"/> |             | 100% エタノール   | 5分   |    | 室温   | 100% エタノール                                |                                                                                                                                                              |                                                    |
|    | <input type="checkbox"/> |             | 100% エタノール   | 10分  |    | 室温   | 100% エタノール                                |                                                                                                                                                              |                                                    |
| ▶  | <input type="checkbox"/> |             | ストップポイント     | ~6カ月 |    | -20℃ | 100% エタノール                                |                                                                                                                                                              |                                                    |
|    | <input type="checkbox"/> | 再水和         | 70%エタノール     | 2分   |    | 室温   | 70%エタノール                                  |                                                                                                                                                              |                                                    |
|    | <input type="checkbox"/> |             | 50%エタノール     | 2分   |    | 室温   | 50%エタノール                                  |                                                                                                                                                              |                                                    |
|    | <input type="checkbox"/> |             | 洗浄           | 10分  |    | 室温   | PBS                                       |                                                                                                                                                              |                                                    |
|    | <input type="checkbox"/> | POD失活       | 過酸化水素 (H2O2) | 10分  |    | 室温   | Hydrogen Peroxide                         | H2O2を拡げるににくいとき、<br>マイクロピペットのチップ/<br>カバーガラス/パラフィルム等                                                                                                           |                                                    |
|    | <input type="checkbox"/> |             | 洗浄           | 1分   | ×2 | 室温   | PBS                                       | 染色バット、金属ラック等                                                                                                                                                 |                                                    |
|    | <input type="checkbox"/> | 細胞透過処理      | 疎水バリア作成      | 5分   |    | 室温   | ImmEdge<br>Hydrophobic Barrier<br>Pen     | 指定のペン以外ではインクが溶けやすい<br>細胞が乾燥しない様に注意                                                                                                                           |                                                    |
|    | <input type="checkbox"/> |             | プロテアーゼ処理     | 10分  |    | 室温   | Protease III<br>(多くのセルラインには<br>PBSで15倍希釈) | <条件検討：proteaseの希釈濃度><br>並行してブロープのプレヒート (40℃、15分)                                                                                                             | プロテアーゼを拡げにくいとき、<br>マイクロピペットのチップ/<br>カバーガラス/パラフィルム等 |
|    | <input type="checkbox"/> |             | 洗浄           | 1分   | ×2 | 室温   | PBS                                       | 切片の剥離やダメージの程度を確認                                                                                                                                             |                                                    |
|    | <input type="checkbox"/> |             | ハイブリダイゼーション  | 2時間  |    | 40℃  | ブロープ液                                     |                                                                                                                                                              |                                                    |
|    | <input type="checkbox"/> | ハイブリダイゼーション | 洗浄           | 2分   |    | 室温   | 1 ×wash buffer                            | 蒸留水や超純水で <b>50倍希釈</b><br>希釈前に析出の有無を確認、作り置き可能                                                                                                                 |                                                    |
| ▶  | <input type="checkbox"/> |             | ストップポイント     | O/N  |    | 室温   | 5×SSC                                     | <u>20X SSC (saline Sodium Citrate)バッファー</u><br>蒸留水もしくは超純水800mlに<br>NaCl: 175.3 g +クエン酸ナトリウム: 88.2 g<br>⇒1M HClで滴下してpH 7.0に調製<br>⇒水で1 Lまでメスアップ<br>⇒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™ 2.5 HD BROWN   |            |      |    |     |                          |                                                    |                                                                                            |
|--------------------------|------------|------|----|-----|--------------------------|----------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| ✓                        | ステップ       | 時間   | 回数 | 温度  | 試薬                       | メモ                                                 | 装置・器具                                                                                      |
| <input type="checkbox"/> | 洗浄         | 2分   |    | 室温  | 1×wash buffer            | 洗浄後、洗浄液をしっかりと除く<br>乾燥・剥離に注意                        | 【スライド洗浄】<br>染色バットと金属ラック<br><br>【洗浄液を吸い取る】<br>綿棒、キムタオルやキムワイブ等<br><br>【試薬反応温度維持】<br>ハイブリオープン |
| <input type="checkbox"/> | AMP1       | 30分  |    | 40℃ | AMP1                     |                                                    |                                                                                            |
| <input type="checkbox"/> | 洗浄         | 2分   | ×2 | 室温  | 1×wash buffer            | 洗浄後、洗浄液をしっかりと除く<br>乾燥・剥離に注意                        |                                                                                            |
| <input type="checkbox"/> | AMP2       | 15分  |    | 40℃ | AMP2                     |                                                    |                                                                                            |
| <input type="checkbox"/> | 洗浄         | 2分   | ×2 | 室温  | 1×wash buffer            | 洗浄後、洗浄液をしっかりと除く<br>乾燥・剥離に注意                        |                                                                                            |
| <input type="checkbox"/> | AMP3       | 30分  |    | 40℃ | AMP3                     |                                                    |                                                                                            |
| <input type="checkbox"/> | 洗浄         | 2分   | ×2 | 室温  | 1×wash buffer            | 洗浄後、洗浄液をしっかりと除く<br>乾燥・剥離に注意                        |                                                                                            |
| <input type="checkbox"/> | AMP4       | 15分  |    | 40℃ | AMP4                     |                                                    |                                                                                            |
| <input type="checkbox"/> | 洗浄         | 2分   | ×2 | 室温  | 1×wash buffer            | 洗浄後、洗浄液をしっかりと除く<br>乾燥・剥離に注意                        |                                                                                            |
| <input type="checkbox"/> | AMP5       | 30分  |    | 室温  | AMP5                     | 反応時間を延長するとシグナル増強<br>＜条件検討：反応時間＞                    |                                                                                            |
| <input type="checkbox"/> | 洗浄         | 2分   | ×2 | 室温  | 1×wash buffer            | 洗浄後、洗浄液をしっかりと除く<br>乾燥・剥離に注意                        |                                                                                            |
| <input type="checkbox"/> | AMP6       | 15分  |    | 室温  | AMP6                     | 1滴の滴下量が他の試薬より多いため、<br>滴下し過ぎに注意                     |                                                                                            |
| <input type="checkbox"/> | 洗浄         | 2分   | ×2 | 室温  | 1×wash buffer            | 洗浄後、洗浄液をしっかりと除く<br>乾燥・剥離に注意                        | マイクロピペット、1.5mlチューブ、<br>チューブラック等                                                            |
| <input type="checkbox"/> | DAB        | 10分  |    | 室温  | DAB-A、DAB-B              | 基質液調製 (DAB-A : DAB-B = 1:1)<br>DABは発癌性物質なので、グローブ着用 |                                                                                            |
| <input type="checkbox"/> | 洗浄         |      |    | 室温  | 蒸留水～超純水                  | 流水で洗浄                                              |                                                                                            |
| <input type="checkbox"/> | 対比染色       | ～30秒 |    | 室温  | 50% Gillの<br>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<br>※ヘマトキシリンが落ちにくいので<br>専用のものを用意するとよい                                           |
| <input type="checkbox"/> | 洗浄         |      |    | 室温  | 水道水                      | 流水で洗浄                                              |                                                                                            |
| <input type="checkbox"/> | 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                          |                                                                                            |
| <input type="checkbox"/> | 洗浄         |      |    | 室温  | 水道水                      | 流水で洗浄                                              |                                                                                            |
| <input type="checkbox"/> | 70% エタノール  | 2分   | ×2 | 室温  | 70% エタノール                |                                                    |                                                                                            |
| <input type="checkbox"/> | 100% エタノール | 2分   | ×2 | 室温  | 100% エタノール               | しっかりと脱水する                                          |                                                                                            |
| <input type="checkbox"/> | キシレン       | 5分   | ×2 | 室温  | キシレン                     |                                                    |                                                                                            |
| <input type="checkbox"/> | 封入         |      |    | 室温  | EcoMount<br>/ Vectamount |                                                    | マイクロピペット、カバーガラス、<br>キムタオル、マッペ等                                                             |