

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	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 (青味を出すため)

固定凍結 (Fixed Frozen)							
任意	✓	ステップ	時間	回数	温度	試薬	装置・器具
	☐	(灌流) 固定	24時間		4℃	10%NBF又は 4%PFA/PBS	必要であれば灌流固定
	固定・凍結	sucurose置換	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% Sucurose/4% PFA/PBSで沈むまで置換も可
			沈むまで		4℃	20% Sucurose/PBS	
			沈むまで		4℃	30% Sucurose/PBS	
		OCT包埋と凍結	5分		on dry ice	Dry Ice & OCT	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
		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
>		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
	☐	ベイクング	30分		60℃		切片の剥離防止に有効
	後固定・脱水	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
		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
	POD失活	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
		洗浄	上下3-5回	x2	室温	蒸留水～超純水	
	☐	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>
	☐	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
	☐	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
	細胞透過処理	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> 並行してブローブのプレヒート (40℃、15分)
	☐	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	ハイブリダイゼーション	2時間		40℃	各ブローブ	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
		洗浄	2分		室温	1 x wash buffer	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、 ディスプレイの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に調製 ⇒水で1 Lまでメスアップ ⇒オートクレーブで滅菌
						↑	RNAscope試薬

RNAscope™ 2.5 HD RED

✓	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	15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	30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	
☐	AMP4	15分		40℃	AMP4		
☐	洗浄	2分	×2	室温	1 × wash buffer	洗浄後、洗浄液をしっかりと除く 乾燥・剥離に注意	
☐	AMP5	30分		室温	AMP5	室温、反応時間を延長するとシグナル増強 <条件検討：反応時間>	
☐	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	
☐	AMP6	15分		室温	AMP6		
☐	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	
☐	Fast Red	10分		室温	Fast Red-A Fast Red-B	基質液調整 (RED-A : RED-B = 60:1) 混合後は3-5分以内に使用する	マイクロピペット、 1.5mlチューブ、チューブラック等
☐	洗浄			室温	蒸留水～超純水	流水で洗浄	
☐	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 専用のものを用意するとよい
☐	洗浄			室温	水道水	流水で洗浄	
☐	アンモニア水			室温	0.02% アンモニア	アルカリで青味を出すため (bluing)、炭酸リチウムも 可、 Fast Redの染まりが悪い時はスキップ	
☐	洗浄			室温	水道水	流水で洗浄	
☐	乾燥	15-30分		60℃		エタノール脱水の代わり Fast Redがエタノールに溶けてしまうため	乾燥機、オープン
☐	キシレン	~2秒		室温	キシレン	封入剤をなじませるため 一瞬だけつけるもしくははたらす	染色バット、金属ラック
☐	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



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-technique.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