

RNAscope™ 2.5 HD Assay Duplex クイックガイド (for FFPE 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>

* 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。

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/>



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 新しいものを用意
	☐	スライドガラス用ラック	
	☐	エタノール	
	☐	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、ヘイキングなど
>	☐	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 /ヒーター付きスターラー等	賦活化液を沸騰させる為
	☐		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
>	☐	1～3 L 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）

FFPE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・薄切	16-32時間		室温	10%NBF	16時間未満或いは32時間以上の場合には RNAscopeの結果が期待以下になる可能性がある	
	☐	脱水・包埋・薄切	ホルマリン固定用の一般的なプロトコルで可				薄切の推奨は5 +/- 1μm	
	☐	ストップポイント			室温		包埋済みブロックは乾燥剤と共に室温で保存可能 (1年以上保存予定の場合は乾燥剤と共に冷蔵保存推奨) 薄切スライドは乾燥剤と共に室温で3か月保存可能	
	☐	ヘイキング	60分		60℃		脱バ効率をあげ、切片の剥離防止に有効	ハイブリオープン/ 乾燥機等
>	☐	ストップポイント	～1週間		室温		乾燥剤を入れ、埃が被らないように	
	☐	キシレン	5分	×2	室温	キシレン	日常行われている方は、普段のプロトコルで可 試薬は新しいものを使用する	染色バット、金属ラック等
	☐	100% エタノール	2分	×2	室温	100% エタノール		
	☐	乾燥	5分		室温			
	☐	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	上下3-5回	×2	室温	蒸留水～超純水	切片の剥離がないことを確認しながら	染色バット、金属ラック等
	☐	賦活化液によるボイル	～15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>	スチーマー/オイルバス/ ヒーター付きスターラー等 アルミ箔/サランラップ等、500mlビーカー、 温度計、ピンセット
	☐	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	
	☐	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	
>	☐	* ヘイキング	～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	
>	☐	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	<条件検討: 反応時間> 並行して プローブのプレヒート (40℃, 15分)	【試薬反応温度維持】 ハイブリオープン
	☐	洗浄	上下3-5回	×2	室温	蒸留水～超純水	プロテアーゼによる切片のダメージの有無を確認	
	☐	ハイブリダイゼーション	2時間		40℃	各プローブ		【試薬反応温度維持】 ハイブリオープン
	☐	洗浄	2分		室温	1 x wash buffer	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、 デイスボの50ml遠沈管やピペット等
>	☐	ストップポイント	O/N		室温	5xSSC	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	スチーマー/オイルバス/ヒーター付きスターラー等 アルミ箔/サランラップ等、500mlビーカー、 温度計、ピンセット
						↑	RNAscope試薬	

RNAscope™ 2.5 HD Duplex

✓	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	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	マイクロピペット、1.5mlチューブ、 チューブラック等 【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
□	Fast Red	10分		室温	Fast Red-A Fast Red-B	基質液調整 (RED-A : RED-B = 60:1)	
□	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	
□	AMP7	15分		40℃	AMP7		
□	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	
□	AMP8	30分		40℃	AMP8		
□	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	
□	AMP9	30分		室温	AMP9		
□	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	
□	AMP10	15分		室温	AMP10		
□	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	
□	GREEN	10分		室温	Green-A Green-B	基質液調整 (Green-A : Green-B = 50:1)	マイクロピペット、1.5mlチューブ、 チューブラック等 【スライド洗浄】 染色バットと金属ラック
□	洗浄	5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	
□	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	青味を出すため (bluing)、炭酸リチウムも可	
□	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、Greenが水に可溶	乾燥機、オープン
□	風乾	5分		室温			
□	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たらす	染色バット、金属ラック
□	封入			室温	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-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