

RNAscope 2.5 HD Detection Reagent – BROWN クイックガイド

アッセイを始める前に

- ◆ RNAscope 2.5 HD Detection Reagent-BROWN は DAB(HRP)を用いて RNA を検出する in situ ハイブリダイゼーションキットです。
- ◆ 必ず英語版ユーザーマニュアルを合わせてお読み下さい。
- ◆ ご使用になるサンプルによって前処理のプロトコールが異なります。3ページのワークフローをご参照下さい。
- ◆ 事前にアッセイに必要な薬品・実験器具をご準備下さい。
- ◆ RNAscope の一般的な使用手順をステップ毎に動画で解説しています。下記リンクの ”トレーニングビデオ” をご参照下さい。 <https://acdbio.com/technical-support/learn-more>

☑ チェックリスト

必要な薬品・実験器具を確認しましょう。 ※ ご使用になるサンプルによって必要な薬品・実験器具が異なります。

✓	FFPE 切片	固定 凍結組 織切片	未固定 凍結組 織切片	培養 細胞	PBMC/ 非接着 細胞		
●	●	●	●	●	●	HybEZ™ オープン(必須)	※ これ以外のオープンを使用不可
●	●	●	●	●	●	IMMEDGE™ 疎水ペン(必須)	※ これ以外のペンは使用不可 PAP ペンは40℃のインキュベーション中に 溶け出す恐れがありますので使用しないで 下さい
●	●	●	●	●	●	SuperFrost®Plus スライドガラス FischerScientific Cat.No.12- 550-15(必須)	※ これ以外のスライド(特にシランコート)は 賦活化中に切片の剥離や RNAscope の試 薬を弾く恐れがあります
●	●	●	●	●	●	エタノール	脱パラフィンと脱水で使用
●	●	●	●	●	●	キシレン	脱パラフィンと脱水で使用
●	●	●	●	●	●	蒸留水	洗浄水やバッファーの希釈液として使用
●	●	●	●	●	●	ヘマトキシリン	ギルのヘマトキシリンを推奨
●	●	●	●	●	●	0.02%アンモニア水	ブルーイングで使用
●	●	●	●	●	●	封入剤	※ キシレンベースの封入剤をご用意下さい
●	●	●	●	●	●	エッペンチューブ	-
●	●	●	●	●	●	ピペット	-
●	●	●	●	●	●	洗浄用容器	-
●	●	●	●	●	●	カバーガラス	-
●	●	●	●	●	●	ろ紙	-
●	●	●	●	●	●	メスシリンダー	-
-	●	●	●	●	●	1XPBS	洗浄水として使用
●	-	-	-	-	-	ドライオープン	ベイキングで使用(60℃まで上がるもの)
●	●	-	-	-	-	500mL ビーカー	ボイルによる賦活化で使用
●	●	-	-	-	-	ホットプレート	ボイルによる賦活化で使用
●	●	-	-	-	-	温度計	ボイルによる賦活化で使用
●	●	-	-	-	-	アルミホイル	ボイルによる賦活化で使用
●	●	-	-	-	-	鉗子 または ピンセット	ボイルによる賦活化で使用
-	-	-	●	-	-	チャンバースライド	Falcon™ Chambered Cell Culture Slides (FischerScientific Cat.No.08-774-25) を推奨

☑ 試薬キットの構成

お手元に必要な試薬キットが全て揃っているか確認しましょう。



	前処理キット			
	H ₂ O ₂ & Protease Plus Reagents	Cat.No. 322300	ピンク色の箱(小) 4℃保存	Hydrogen Peroxide 2本及び Protease Plus 1本入り
	Target Retrieval Reagents	Cat.No. 322000	ピンク色の箱(大) 室温保存	70mLx4本入り
	検出キット			
	Detection Reagents - BROWN	Cat.No. 322310	黄色の箱(小) 4℃保存	Amp 1~6及び DAB-A、DAB-B 入り
	Wash Buffer Reagents	Cat.No. 310091	黄色の箱(大) 室温保存	60mLx4本入り
	コントロールスライド ※ターゲットがヒトの場合は Hela セルペレット、Mouse/Rat の場合は3T3セルペレットをご購入下さい。			
	Human Hela Cell pellet	Cat.No. 310045	青色の箱(小) 室温保存	4枚入り
	Mouse 3T3 Cell Pellet	Cat.No. 310023	青色の箱(大) 室温保存	4枚入り
	プローブ ※ターゲットと同一動物種のコントロールプローブをご購入下さい。			
	ターゲットプローブ (C1)	Cat.No.ターゲット毎	4℃保存	3mL
	ポジティブコントロールプローブ	Cat.No.ターゲット毎	4℃保存	3mL
	ネガティブコントロールプローブ	Cat.No.ターゲット毎	4℃保存	3mL

※ 新鮮凍結組織 及び 培養細胞を使用する場合は、Protease III & Protease IV Reagents (Cat.No. 322340) を別途ご購入頂く必要があります。

○ ポジティブコントロールプローブに使用されているハウスキーピング遺伝子(ターゲットの発現量によって下記のどれか一つ)

- *POLR2A* (DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB1)
- *PP1B* (Cyclophilin B)
- *UBC* (ubiquitin C)

○ ネガティブコントロールプローブに使用されている遺伝子

- *DapB* (Dihydrodipicolinate reductase) : バクテリア (Bacillus subtilis strain SMY) 由来の酵素遺伝子でヒトやマウス等には交差しないため、動物種を問わずネガティブコントロールとしてご使用になれます。

固定方法の確認

ご使用になるサンプルによって推奨の固定方法が異なります。詳しくは下記の英語版ユーザーマニュアルをご参照下さい。

- ◆ FFPE 切片 : 10% 中性緩衝ホルマリン (NBF) で16~32時間 室温 ⇒ 切片の厚さ 5±1µm
- ◆ 固定凍結組織切片 : 4%PFA/PBS で24時間 4℃ ⇒ 切片の厚さ 7~15µm
- ◆ 未固定凍結組織切片 : 10%NBF または 4%PFA/PBS で15分 4℃ ⇒ 切片の厚さ 10~20µm
- ◆ 培養細胞 : 10%NBF で30分 室温 ⇒ 80% コンフルエント

英語版ユーザーマニュアル

- ・ 必ずこちらの英語版ユーザーマニュアルを合わせてお読み下さい。
- ・ RNAscope のユーザーマニュアルは PART1 と PART2 に分かれています。

PART1 (固定及び前処理)

FFPE 切片	Formalin-Fixed Paraffin-Embedded (FFPE) Sample Preparation and Pretreatment PART1	Doc.No. 322452
	RNAscope 2.5 HD Detection Kit (BROWN) Quick Guide	Doc.No. 322310-QCK
固定凍結組織切片	Sample Preparation Technical Note for Fixed Frozen Tissue Using RNAscope 2.5 Chromogenic Assay (Single-plex and Duplex)	Doc.No. 320534
未固定凍結組織切片	Sample Preparation Technical Note for Fresh Frozen Tissue Using RNAscope 2.5 Chromogenic Assay (Single-plex and Duplex)	Doc.No. 320536
培養細胞	Sample Preparation Technical Note for Cultured Adherent Cells Using RNAscope 2.5 Chromogenic Assay (Single-plex and Duplex)	Doc.No. 321232
PBMC/非接着細胞	Sample Preparation Technical Note for PBMC and Non-Adherent Cells Using RNAscope Chromogenic Assay	Doc.No. 321230

PART2 (検出)

サンプル全共通	RNAscope 2.5HD Detection Reagent -BROWN User Manual PART2	Doc.No. 322310
---------	---	----------------

☑ RNAscope ワークフロー

- ご使用になるサンプルによって、前処理のステップとプロテアーゼの種類が異なります。
- 1日でアッセイが終わらない時は、下記のストップポイント ①～③ でアッセイを中断して下さい。

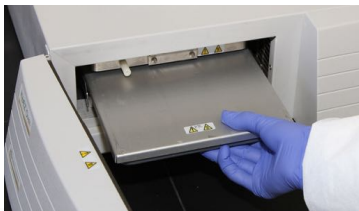
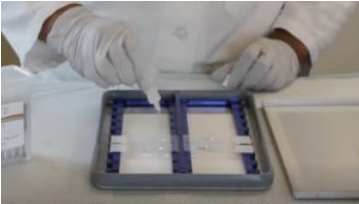
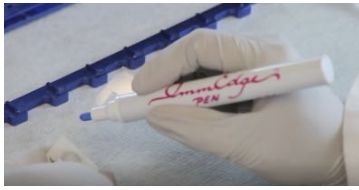
ステップ	FFPE 切片	固定凍結組織切片	未固定凍結組織切片	培養細胞	PBMC または非接着細胞
STEP1 約3時間 前処理	1. バイキング				
	ストップポイント ①				
	2. 脱パラフィン				
	ストップポイント ②				
	3. H ₂ O ₂ ブロック 4. 賦活化	1. H ₂ O ₂ ブロック 2. 賦活化	1. H ₂ O ₂ ブロック	1. H ₂ O ₂ ブロック	1. H ₂ O ₂ ブロック
	ストップポイント ③				
	5. プロテアーゼ	3. プロテアーゼ	2. プロテアーゼ	2. プロテアーゼ	2. プロテアーゼ
STEP2 2時間 ハイブリダイズ	6. プローブハイブリダイゼーション	4. プローブハイブリダイゼーション	3. プローブハイブリダイゼーション	3. プローブハイブリダイゼーション	3. プローブハイブリダイゼーション
STEP3 約3時間 増幅	7. AMP 1	5. AMP 1	4. AMP 1	4. AMP 1	4. AMP 1
	8. AMP 2	6. AMP 2	5. AMP 2	5. AMP 2	5. AMP 2
	9. AMP 3	7. AMP 3	6. AMP 3	6. AMP 3	6. AMP 3
	10. AMP 4	8. AMP 4	7. AMP 4	7. AMP 4	7. AMP 4
	11. AMP 5	9. AMP 5	8. AMP 5	8. AMP 5	8. AMP 5
	12. AMP 6	10. AMP 6	9. AMP 6	9. AMP 6	9. AMP 6
STEP4 約1時間 シグナル検出	13. DAB 発色	11. DAB 発色	10. DAB 発色	10. DAB 発色	10. DAB 発色
	14. 対比染色	12. 対比染色	11. 対比染色	11. 対比染色	11. 対比染色
	15. 脱水	13. 脱水	12. 脱水	12. 脱水	12. 脱水
	16. 封入	14. 封入	13. 封入	13. 封入	13. 封入
	17. 観察	15. 観察	14. 観察	14. 観察	14. 観察

- ストップポイント ① バイキングのあと、風乾・室温で一週間まで放置可能
 ストップポイント ② 脱パラのあと、風乾・室温で一日のみ放置可能 ※24時間以内にアッセイを再開すること
 ストップポイント ③ 賦活化のあと、風乾・室温で一日のみ放置可能 ※これ以降ストップポイントはありません

サンプル	プロテアーゼの種類	プロテアーゼの時間と温度
FFPE 切片	プロテアーゼ Plus	30分 40℃
固定凍結組織切片	プロテアーゼ III	30分 40℃
未固定凍結組織切片	プロテアーゼ IV	30分 室温
培養細胞	プロテアーゼ III (1XPBS で15倍希釈※1)	10分 室温
PBMC または非接着細胞	プロテアーゼ III	30分 40℃

※1 サンプルに応じて希釈を調整して下さい。

前処理 PART1



⑤ プロテアーゼ

- ① 切片を青いスライドホルダーに並べる
- ② 疎水ペンで切片を囲う 約**1分**乾燥
- ③ Protease Plus を切片が完全に覆われるように数滴滴下する
- ④ 切片の乗った青いスライドホルダーを、濡らしたろ紙を敷いたオーブントレイ(湿潤箱)に入れフタをする
- ⑤ トレイを HybEZ™ オープンに挿入する
- ⑥ インキュベーション **40℃ 30分**
- ⑦ HybEZ™ オープンからトレイを取り出す
- ⑧ スライド上の試薬を吸水紙の上で軽くタップして落とし、蒸留水の入った容器に移す
- ⑨ 蒸留水で洗浄(室温) ラックを3~5回蒸留水の中で上下させる

- ・ HybEZ™ オープンを使用します。オープンはあらかじめ40℃に温めておく。
- ・ HybEZ™ オープンに付随しているトレイを湿潤箱として使用します。トレイの中に入る紙を敷き、蒸留水で濡らしておく。

※ 使用するサンプルによってプロテアーゼの種類や反応条件が異なります。3ページを参考にしてください。

○ 未固定凍結組織切片または培養細胞、非接着細胞の場合は、洗浄に1XPBSを使用して下さい。

検出 PART2

① プローブハイブリダイゼーション

- ① プローブを切片が完全に覆われるように数滴滴下する
- ② オープンに挿入する
- ③ ハイブリダイゼーション **40℃ 2時間**
- ④ オープンから取り出す
- ⑤ スライド上の試薬を吸水紙の上で軽くタップして落としてから Wash バッファーの入った容器に移す
- ⑥ Wash バッファーで洗浄(室温) **2分**浸漬を**2回**繰り返す

- ・ HybEZ™ オープンを使用します
- ※ ここから洗浄液は蒸留水で50倍希釈した Wash バッファーに変わります。

② シグナル増幅

下に従って、順次 AMP1~6を切片が完全に覆われるように数滴滴下していく。



AMP 1 40℃ 30分

↓ Wash バッファーで洗浄 2分浸漬を2回繰り返す(室温)

AMP 2 40℃ 15分

↓ Wash バッファーで洗浄 2分を2回

AMP 3 40℃ 30分

↓ Wash バッファーで洗浄 2分を2回

AMP 4 40℃ 15分

↓ Wash バッファーで洗浄 2分を2回

AMP 5 室温 30分

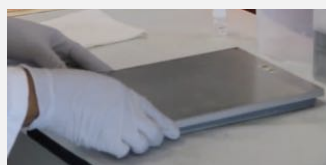
↓ Wash バッファーで洗浄 2分を2回

AMP 6 室温 15分



↓ Wash バッファーで洗浄 2分を2回

AMP5とAMP6はオーブントレイ(湿潤箱)を使う。右の写真のようにフタを閉じ、室温でベンチトップに静置する。(濡らしたろ紙を入れて湿度を保つ)



❗ プローブをハイブリダイズ後は組織が乾かないようにする。スライドの枚数が多い場合は乾かないように一枚ずつ [Wash バッファーを取り除く → AMP を滴下] を繰り返す。

- ・ 各 AMP 間は、スライド上の AMP を吸水紙の上で軽くタップして落としてから、Wash バッファーの入った容器に移す。
- ・ Wash 後は、切片の周りの余分な Wash バッファーを吸水紙の上で軽くタップして落としてから、次の AMP を滴下する。

- AMP1~4は HybEZ™ オープンを使用
- AMP5とAMP6は室温での反応

☑ RNAscope を始めましょう

- キットに含まれるすべての試薬を室温に戻して下さい。
- HybEZ™ オープンのスイッチを入れ、使用前に40℃まで温めておく。
- Target Retrieval (賦活化バッファー) 40mL を蒸留水で10倍希釈して400mL に調整後、500mL ビーカーに移しておく。
- Wash バッファーが白く沈殿している場合、温めて溶かして下さい。完全に溶解後、Wash バッファー 40mL を蒸留水で50倍希釈して2L に調整する。(大容量で作り置き可能。室温で半年間保存できます。一度のアッセイで約2L 使用します。)
- プローブ(ターゲットプローブ、ポジコン、ネガコン) を40℃で温めて、浮遊物を完全に溶かす。※室温での静置や、手で握っても溶けません。40℃のオープンの下の隙間にプローブを差し入れ、10分以上温めましょう。完全に溶解後、使用前までに室温に戻しておく。

前処理 PART1

① 베이キング 60℃ 1時間

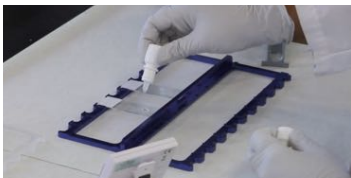
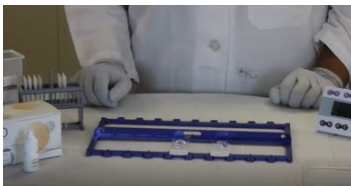
- ・ドライオープンを使用



② 脱パラフィン 室温

- ① キシレン1 5分
- ② キシレン2 5分
- ③ 100%エタノール1 1分
- ④ 100%エタノール2 1分
- ⑤ 風乾 約5分

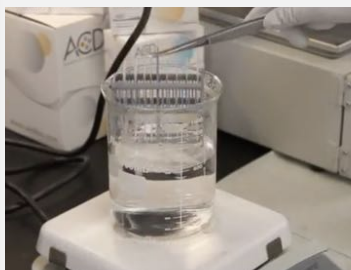
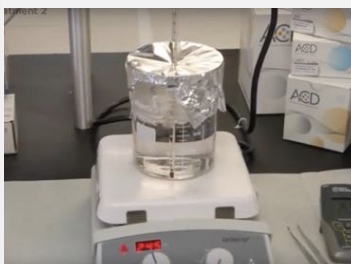
- ・新しい試薬をご準備下さい。
- ・試薬は切片が十分に浸るくらいの量を各染色容器に用意する。
- ・左に従って、順次切片を浸漬する。
- 風乾は完全乾燥させます。乾燥が不十分な場合、シグナルのムラの原因になります。



③ 内在性 HRP ブロック

- ① 切片を青いスライドホルダーに並べる
- ② Hydrogen Peroxide を切片が完全に覆われるように数滴滴下し、室温で静置 10分
- ③ スライド上の試薬を吸水紙の上で軽くタップして落とし、蒸留水の入った容器に移す
- ③ 蒸留水で洗浄(室温) ラックを3~5回蒸留水の中で上下させる
- ④ 同様に、新しい蒸留水で洗浄をもう一回繰り返す

- FFPE 切片以外のサンプルはここからアッセイをスタートします**
- 固定凍結組織切片は1XPBSに5分間浸し、OCTを取り除いて下さい。
 - 未固定凍結組織切片または培養細胞、非接着細胞の場合は、洗浄に1XPBSを使用して下さい。

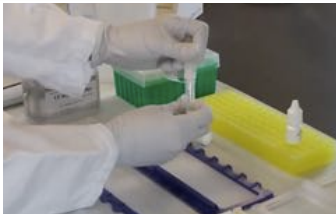


④ ボイルによる賦活化

- ① 10倍希釈した Target Retrieval の入ったビーカーをホットプレートに乗せる
- ② ビーカーにアルミホイルを被せ、その上から温度計を刺し、沸騰を始める
- ⚠ **突沸に注意!**
沸騰中は目を離さないこと!
- ③ 98~102℃一定になったらラックごと静かに浸し、アルミホイルでフタをする
- ④ 賦活化
FFPE 切片: 15分~
固定凍結組織: 5分
- ⑤ 蒸留水で洗浄(室温)ラックを3~5回蒸留水の中で上下させた後、15秒以上浸す
- ⑥ 100%エタノールに浸し脱水 5分
- ⑦ 風乾 約5分

- 必ずホットプレートをご使用下さい。
- ・電子レンジやオートクレーブは不可
- ・賦活化前に Target Retrieval を30分以上沸騰させないこと。液量が減少し、濃度が変わります。
- ・温度計を使用し、必要温度を一定に保って下さい。賦活化中は気泡が発生します。
- 賦活化後、切片をバッファーに浸したまま容器ごと冷却しないこと。反応が進み切片がボロボロになります。賦活化後は切片を直ちに蒸留水に移して反応を止めます。
- ・ Target Retrieval は再利用できません。賦活化後室温まで冷まし、流しに捨てて下さい。
- ※ 未固定凍結組織切片または培養細胞、非接着細胞は、賦活化は必要ありません。

検出 PART2



③ DAB 発色

- ① 使用直前に DAB-A と DAB-B をエッペンチューブに等量ずつ滴下し、よく混ぜる
- ② DAB 混合液をピペットで切片に滴下する
- ③ オープントレイを使用しフタを閉じた状態でベンチトップに静置する **10分 室温(遮光)**
- ④ 蒸留水で洗浄(室温) ラックを3~5回蒸留水の中で上下させる
- ⑤ 新しい蒸留水で、洗浄をもう一回繰り返す



DAB は発がん性があるため、手袋を用いて直接触れないように注意する。廃液については決まった容器に貯蔵保管し廃棄する。

※ 混合した DAB 液は保存できませんので、使い切ってください。



④ カウンター染色

- ① 50%ヘマトキシリンに浸す **2分**(室温)
- ② 水道水で数回色出しする
- ③ 0.02%アンモニア水に浸す。ラックを3~5回溶液中で上下させた後**10秒**浸す
- ④ 水道水で洗浄。ラックを3~5回水中で上下させる

・新しい試薬をご準備下さい。

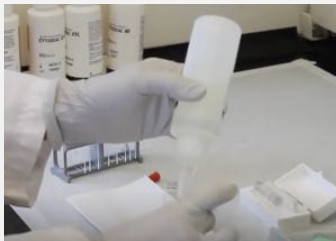
・基質の発色に応じて、ヘマトキシリンの希釈や染色時間を調整して下さい。



⑤ 脱水

- ① 70%エタノール **2分**
- ② 95%エタノール **2分**
- ③ 95%エタノール **2分**
- ④ キシレン **5分**

・新しい試薬をご準備下さい。

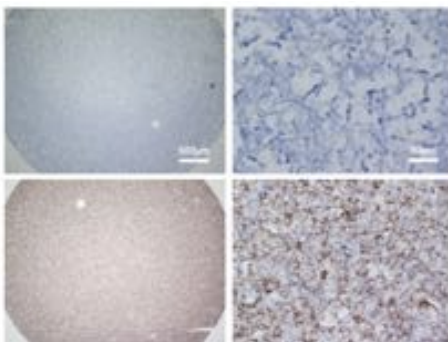


⑥ 封入

- ① キシレンベースの封入剤で封入する
- ② **5分**以上乾燥させる

⑦ 観察

コントロールスライド(Mouse 3T3 Cell Pellet) 染色例
 上: ネガティブコントロール(DapB)の染色画像
 下: ポジティブコントロール(PPIB)の染色画像
 前処理時間: 賦活化15分/プロテアーゼ30分



お問い合わせ

製品の技術的なご質問にお応えします。ご不明なことがございましたら、お気軽にご相談くださいませ。

望月 明日香 医学博士

フィールド・アプリケーション・サイエンティスト

Advanced Cell Diagnostics

〒103-0022 東京都中央区日本橋室町 3-4-7 ヒューリック日本橋室町ビル 9 階(プロテインシンプルジャパン内)

TEL : 03-5542-1436(プロテインシンプルジャパン内)

FAX : 03-5542-1437

EMAIL : amochizuki@acdbio.com

WEB : <https://acdbio.com>

