



Stellaris[®] RNA FISH

C. elegans のプロトコル

I. 試薬保存条件と試薬・器材の準備

製品解説

Stellaris RNA FISH プロブセットは、ターゲットとなる転写物に選択的に結合するように設計された、最大 48 種類のシングル・ラベルされたオリゴヌクレオチドから構成されています。ターゲット RNA に結合した Stellaris RNA FISH プロブは蛍光シグナルを生じます。このシグナルにより、単一の RNA 分子が回折限界スポットとして従来の蛍光顕微鏡法で検出可能になります。

プロブ・試薬保存のガイドライン

【 Stellaris RNA FISH プロブ 】

Stellaris RNA FISHプロブは乾燥した状態で出荷されます。この状態で+2~+8℃で保存可能です。溶解したプロブミックスは、凍結溶解サイクルを最小限にとどめてください。溶解後のプロブミックスは、+2~+8℃の暗所にて最大1か月までの保存が推奨されます。保存期間が1か月を超える場合、プロブを分注し、-15~-30℃の暗所にて保存することを推奨します。

【 Stellaris RNA FISH ハイブリダイゼーションバッファー 】

Stellaris RNA FISH ハイブリダイゼーションバッファーは、短期または長期の使用においても、+2~+8℃で保存してください。

【 Stellaris RNA FISH Wash Buffer A と Wash Buffer B 】

Stellaris RNA FISH Wash Buffer A と Wash Buffer B は、短期または長期の使用においても、+2~+8℃で保存してください。

試薬と器材

【 試薬と消耗品 】

- M9 バッファー
- 脱色液
- TE バッファー (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)
- 37% ホルムアルデヒド溶液
- 10X Phosphate Buffered Saline (PBS) (RNaseフリー)
- Nucleaseフリー水
- 脱イオン化ホルムアミド
- エタノール (分子生物学用グレード)
- Stellaris RNA FISH ハイブリダイゼーションバッファー (LGC Biosearch Technologies Cat# SMF-HB1-10)
- Stellaris RNA FISH Wash Buffer A (LGC Biosearch Technologies Cat# SMF-WA1-60)
- Stellaris RNA FISH Wash Buffer B (LGC Biosearch Technologies Cat# SMF-WB1-20)
- DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)
- Vectashield[®] Mounting Medium (Vector Laboratories Cat #H-1000)
- 2ウェル カバーガラスチャンバー
- 18 x 18 mm 正方形 #1 カバーガラス
- RNase フリーの消耗品(ピペットチップ等)
- 加湿チャンバー (または同等品): 150mmの組織培養プレートに、水を最大限に満たしたペーパータオル一枚を内側のチャンバーの縁に沿って敷いたもの
- 37℃ラボラトリーオープン

【顕微鏡】

- 広視野蛍光顕微鏡 (e.g., Nikon Eclipse Ti または同等品)
※共焦点顕微鏡を使用したアプリケーションに対しては、限られたサポートしかご提供できません。
- 大きな開口数 (NA >1.3) の 60-100x 油浸対物レンズ
- 水銀またはメタルハライドランプのような強い光源 (新しいLEDベースの光源も可)
- 蛍光色素に適応するフィルターセット
- 標準的な冷却CCDカメラ (スピードの速さよりも暗いレベルのイメージングに適したものが理想的(ピクセルサイズ13µm以下が理想的))

試薬の調製

注: Stellaris RNA FISH を実施する際は、RNA 分解を制限することが不可欠です。全ての消耗品と試薬が RNase フリーであることを確認してください。以下の配合はセット容量のためのものです。適宜ご調製ください。

i. 乾燥プローブストックの再構成:

ShipReady プローブセット (1 nmol): ShipReady プローブセットでは、最大80回のハイブリダイゼーションを行うことができます。80µLのTEバッファー (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.0) で乾燥オリゴヌクレオチドプローブ混合物を再溶解し、12.5 µMのプローブストックを調製します。上下によくピペティングして混合した後、短時間ボルテックスをかけ遠心します。

DesignReady または カスタムプローブセット (5 nmol): DesignReadyまたはカスタムプローブセットでは、最大400回のハイブリダイゼーションを行うことができます。400 µL のTE バッファー (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) で乾燥オリゴヌクレオチドプローブ混合物を再溶解し、12.5 µMのプローブストックを調製します。上下によくピペティングして混合した後、短時間ボルテックスをかけ遠心します。

ii. M9 バッファー:

最終容量 **1L** の場合、以下を混合します:

- 5.8 g Na₂HPO₄
- 3.0 g KH₂PO₄
- 0.5 g NaCl
- 1.0 g NH₄Cl

Nucleaseフリー水で最終容量1000mLに調製します。

iii. 脱色液:

- 7.2 mL 5N NaOH
- 4.5 mL 6% NaClO
- 40 mL Nucleaseフリー水

iv. 固定化バッファー:

1X PBS に3.7% (vol./vol.) ホルムアルデヒドが含まれるように調製します。

最終容量 **10mL** の場合、以下を混合します:

- 1 mL 37% ホルムアルデヒド溶液
- 1 mL 10X Phosphate Buffered Saline (PBS), RNaseフリー
- 8 mL Nuclease フリー水

v. ハイブリダイゼーションバッファー:

ハイブリダイゼーションバッファーに10% (vol./vol.) ホルムアミドが含まれるように調製します。

ハイブリダイゼーションバッファーは実験ごとに新鮮なものを調製してください:

溶液に粘度があるため、全てのサンプルに対し十分な量を確保するために終容量を10%過剰な量に調製することを推奨します。

最終容量 1 mL の場合、以下を混合します :

900 µL Stellaris RNA FISH ハイブリダイゼーションバッファー (LGC Biosearch Technologies Cat# SMF-HB1-10)

100 µL 脱イオン化ホルムアミド

注: ハイブリダイゼーションバッファーは凍結しないでください。

警告! ホルムアミドは皮膚を通して容易に吸収される催奇剤ですので、化学物質換気フード内で使用してください。

警告! ボトルを開く前に必ずホルムアミドを室温に戻してください。

vi. Wash Buffer A (10 mL):

1X Wash Buffer A に10% (vol./vol.) ホルムアミドが含まれるように調製します。

Wash Buffer A は実験ごとに新鮮なものを混合・希釈してください:

最終容量 10 mL の場合、以下を混合します :

2 mL Stellaris RNA FISH 5X Wash Buffer A (LGC Biosearch Technologies Cat# SMF-WA1-60)

7 mL Nucleaseフリー水を添加

1 mL 脱イオン化ホルムアミドを添加

穏やかにボルテックスをかけて混合します。

vii. Wash Buffer B:

最初の使用にあたり、Wash Buffer B のボトルにNucleaseフリー水を添加します。

使用前にボトル (LGC Biosearch Technologies Cat# SMF-WB1-20) に88 mLのNucleaseフリー水を添加します。
十分に混合します。

viii. ハイブリダイゼーション後の核染色:

4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) を5 ng/mLになるようにWash Buffer A (上記参照) に溶解します。
この溶液は、下記のハイブリダイゼーションStep 10で使用します。

ix. マウンティング溶液:

Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories #H-1000)

注: 最良の結果を得るために、Vectashield Mounting Mediumでマウントしたサンプルは同日中に撮像してください。

II. C. elegans のプロトコル

注: このプロトコルは Raj 研究室のプロトコル³を変更して作成していますが、LGC Biosearch Technologies 社では検証されていません。現在 LGC Biosearch Technologies 社では C.elegans に対し Stellaris プローブを使用した実験に関して、限られたサポートしか提供することができません。

C. elegans 胚の固定化

1. 妊娠した雌雄同体のプレートに5mLのM9バッファーを添加し、表面から虫を解放させるようにかき回します。
虫を15mLコニカル遠心チューブへ移動させます。
2. これとこの後のステップで、Nucleaseフリー水をM9の代わりに使用することができます。
3. スピンダウンし、脱色液を添加します。
4. およそ4~8分間、虫が見えなくなり胚のみ残るようになるまでボルテックスをかけます。
5. スピンダウンし、上清を吸引し、続いてM9バッファーで2回洗浄します。
6. 1 mLの固定化バッファーに再懸濁し、マイクロ遠心チューブに移し、室温で15分間インキュベートします。
7. ボルテックスをかけ、次いで直ちにチューブを液体窒素に1分間浸漬して凍結し、胚の卵殻にひびを入れます。
8. 室温の水の中で溶解します。

9. 溶解したら、ボルテックスをかけ、20分間氷上に置きます。
10. スピンドウンして上清を吸引し、1 mL の1X PBSで2回洗浄します。
11. 透過化処理のため、1mLの70% (vol./vol) エタノールを添加し、+2~+8 °Cにて一晩保存します。胚は70%エタノール中で+2~+8°Cにおいて最長1週間まで保存可能です。

C. elegans 幼虫の固定化

1. OP50を播種したプレート上で幼虫を生育します。
2. 5mLのM9バッファーを添加し、表面から虫を解放させるようにかき回し、虫を15mLコニカル遠心チューブへ移動させます。
3. これとこの後のステップで、Nucleaseフリー水をM9の代わりに使用することができます。
4. 虫をスピンドウンし、上清を吸引します。
5. 5mLのM9バッファーで洗浄します。
6. 虫をスピンドウンし、上清を吸引します。
7. 1mLの固定化バッファーを加え、マイクロ遠心チューブに移し、室温で45分間インキュベートします。
8. スピンドウンし、上清を吸引し、1mLの1X PBSで2回洗浄します。
9. 透過化処理のため、1mLの70% (vol./vol) エタノールを添加し、+2~+8 °Cにて一晩保存します。幼虫は70%エタノール中で+2~+8°Cにおいて最長1週間まで保存可能です。

カバーグラスチャンバーを用いた C. elegans のハイブリダイゼーション

溶解済みのプローブを凍結している場合、使用前にプローブ溶液を室温に戻します。ボルテックスでよく混ぜ、短時間遠心します。プローブを含むハイブリダイゼーションバッファーの調製には、1 μ L のプローブストックをハイブリダイゼーションバッファーストック 100 μ L に添加し、ボルテックスで混合し、遠心します (カバーグラス 1 枚に対し十分な量)。これにより 125 nM の機能するプローブ溶液が調製できます。この溶液は step 4 で使用します。

1. 固定した細胞を遠心し、70%エタノールを吸引します。
2. 1 mL のWash Buffer A (上記の配合を参照) を添加し、室温で2~5分間インキュベートします。
3. 加湿チャンバーを構築します：150mmの組織培養プレートに、水を最大限に満たしたペーパータオル一枚を内側のチャンバーの縁に沿って敷いたもの。このチャンバーはカバーグラスの下からプローブ溶液が蒸発するのを防ぎます。
4. Wash Buffer Aを吸引し、プローブを含む100 μ Lのハイブリダイゼーションバッファーをカバーグラスチャンバー中のC. elegans 胚または幼虫に滴下します。
5. きれいな 18 x 18 mm #1 カバーグラスを、カバーグラスチャンバー中の胚または幼虫の上にやさしく載せます。
6. カバーグラスチャンバーを加湿チャンバーの中に入れます。加湿チャンバーに蓋をし、パラフィルムでシールします。
7. 37°Cの暗所で最低4時間インキュベートします (インキュベーションは最大16時間まで)。
8. 1 mL のWash Buffer Aをカバーグラスチャンバーに添加します。カバーグラス下の胚または幼虫を傷つけないよう、ピンセットを用いて18 x 18 mm のカバーグラスを慎重に取り除きます。
9. 37°Cの暗所で30分間インキュベートします。
10. Wash Buffer Aを吸引し、核の対比染色のために1 mL のDAPI 核染色液 (Wash Buffer A 中の 5 ng/mL DAPI) を添加します。
11. 37°Cの暗所で30分間インキュベートします。
12. DAPI染色液を吸引し、1 mL のWash Buffer Bを添加します。室温で2~5分間インキュベートします。
13. Vectashield Mounting Mediumの小滴(およそ15~30 μ L) をカバーグラスチャンバー中の C. elegans 胚または幼虫の上に滴下します。18 x 18 mm #1 カバーグラスを胚または幼虫の上に載せ、液が均一に広がるようにします。

イメージング過程へ

References

1. Raj, A., van den Bogaard, P., Rifkin, S.A., van Oudenaarden, A., and Tyagi, S. Imaging individual mRNA molecules using multiple singly labeled probes. Nat. Methods 2008; 5, 877-9.
2. Femino, A.M., Fay, F.S., Fogarty, K., and Singer, R.H. Visualization of single RNA transcripts in situ. Science 1998; 280: 585-590.
3. Raj A, Tyagi S. Detection of individual endogenous RNA transcripts in situ using multiple singly labeled probes. Methods in Enzymology 2010; 472: 365-86.

科学論文における Stellaris® RNA FISH プローブ使用の引用・Methods の記述に関するガイドライン

論文原稿の **Materials and Methods** または **Methods** セクションに、Stellaris RNA FISH プローブおよび/またはプロトコルを使用したことを記述してください。以下の例を Stellaris RNA FISH プローブセットおよび/または プロトコルを引用するためのガイドラインとして参照してください。

ShipReady および DesignReady プローブセットを引用する場合: “Stellaris® FISH Probes recognizing <遺伝子セット名> and labeled with <選択した色素> (Catalog #, LGC Biosearch Technologies, Inc., Petaluma, CA) were hybridized to <サンプル>, following the manufacturer’s instructions available online at www.biosearchtech.com/support/resources/stellaris-protocols.” を記述し、<公開されているプロトコルと異なる内容または実際に行ったことの概要>も簡潔に記述してください。

Stellaris® FISH Probe Designerで設計したカスタムプローブセットを引用する場合: “Custom Stellaris® FISH Probes were designed against <対象の RNA (関連する場合はNM# とカバーされたヌクレオチドも含める)> by utilizing the Stellaris® FISH Probe Designer (LGC Biosearch Technologies, Inc., Petaluma, CA) available online at www.biosearchtech.com/stellarisdesigner. The <サンプル> were hybridized with the <対象のRNA> Stellaris FISH Probe set labeled with <選択した色素> (LGC Biosearch Technologies, Inc.), following the manufacturer’s instructions available online at www.biosearchtech.com/support/resources/stellaris-protocols.” を記述し、<公開されているプロトコルと異なる内容または実際に行ったことの概要>も簡潔に記述してください。

以前に出版された配列を用いたカスタムプローブセットを引用する場合: “Custom Stellaris® FISH Probes recognizing <対象の RNA (関連する場合はNM# とカバーされたヌクレオチドも含める)> and labeled with <選択した色素>, were purchased from LGC Biosearch Technologies, Inc. (Petaluma, CA). Probe set sequences utilized in the experiments have been previously described <引用する論文を記載>. The <サンプル> were hybridized with the <対象のRNA> Stellaris® FISH Probe set, following the manufacturer’s instructions available online at www.biosearchtech.com/support/resources/stellaris-protocols.” を記述し、<公開されているプロトコルと異なる内容または実際に行ったことの概要>も簡潔に記述してください。

Stellaris RNA FISHに使用するための3’ Amine Oligos (プレート供給) を引用する場合 (Stellaris® FISH Probe Designerで設計した場合): “Custom 3’ amine oligos in plates were designed against <対象の RNA (関連する場合はNM# とカバーされたヌクレオチドも含める)> by utilizing the Stellaris® FISH Probe Designer (LGC Biosearch Technologies, Inc., Petaluma, CA) available online at www.biosearchtech.com/stellarisdesigner. Probes were labeled with <選択した色素> using <お客様のラベリングのプロトコルまたは以前出版されたラベリングのプロトコルを引用して記載>. The <サンプル> were hybridized with the <対象となるRNA> oligonucleotides (LGC Biosearch Technologies, Inc.), following the manufacturer’s instructions available online at www.biosearchtech.com/support/resources/stellaris-protocols.” を記述し、<公開されているプロトコルと異なる内容または実際に行ったことの概要>も簡潔に記述してください。

Stellaris RNA FISHに使用するための3’ Amine Oligos (プレート供給) を引用する場合 (以前に出版された配列を用いる場合): “Custom 3’ amine oligos in plates recognizing <対象の RNA (関連する場合はNM# とカバーされたヌクレオチドも含める)> were purchased from LGC Biosearch Technologies, Inc. (Petaluma, CA). Probe set sequences utilized in the experiments have been previously described <引用する論文を記載>. Probes were labeled with <選択した色素> using <お客様のラベリングのプロトコルまたは以前出版されたラベリングのプロトコルを引用して記載>. The <サンプル> were hybridized with the <対象のRNA> oligonucleotides (LGC Biosearch Technologies, Inc.), following the manufacturer’s instructions available online at www.biosearchtech.com/support/resources/stellaris-protocols.” を記述し、<公開されているプロトコルと異なる内容または実際に行ったことの概要>も簡潔に記述してください。

テクニカルサポート

追加情報や技術的なサポートに関するお問い合わせは、
reagents@primetech.co.jp
または 電話 : 03-3816-0851 までご連絡ください。

本プロトコルは、LGC Biosearch Technologies 社 の「Stellaris[®] RNA FISH Protocol for *C. elegans*」(UI-207273 Rev. 1.0, Eff. Date: 14 Apr 2015) を基に作成しました。
Stellaris[®]は LGC Biosearch Technologies 社 の登録商標です。



公認代理店：

プライムテック株式会社 www.primetech.co.jp

本 社：〒112-0002 東京都文京区小石川1-3-25 小石川大国ビル2F

Phone : (03) 3816-0851 (代表) Fax.: (03) 3814-5080 E-mail : reagents@primetech.co.jp

rev01 (201803E)