



Stellaris[®] RNA FISH

接着細胞の免疫蛍光染色+FISH 段階染色プロトコル

I. 試薬保存条件と試薬・器材の準備

製品解説

Stellaris RNA FISH プローブセットは、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 プロー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。

プローブ・試薬保存のガイドライン

【 Stellaris RNA FISH プローブ 】

Stellaris RNA FISHプロー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。溶解したプローブミックスは、凍結溶解サイクルを最小限にとどめてください。溶解後のプローブミックスは、+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、プローブを分注し、-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 】

- 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
- Triton X-100
- 一次抗体
- 二次抗体
- 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)
- 18 mm 丸#1 カバーガラス
- 12 ウェル培養プレート
- 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): 150 mmの組織培養プレートの底部に、水を最大限に含ませたペーパータオルを平らに敷き、その上にパラフィルムを一層載せたもの。
- Superfrost[™] Plus マイクロスライドグラス
- 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. 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

iii. 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。

iv. 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。

v. 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。

vi. 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。

vii. 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. 接着細胞の IF + FISH 段階染色プロトコル

注: このプロトコルは 12 ウェルプレートシステムに適応しています。このプロトコルをお客様の選択されたプロトコルに適応させるためには、容量を適宜調整してください。

段階的 IF + FISH のための接着細胞株の固定化

1. 12-ウェル細胞培養プレート中の18 mm 丸型 #1カバーガラスの上で細胞を培養します。
2. 生育培地を吸引し、1 mL の1XPBSで洗浄します。
3. 1 mL の固定化バッファーを添加します。
4. 室温で10分間インキュベートします。
5. 1 mL の1X PBSで2回洗浄します。
6. 透過化処理のため、細胞を1 mLの0.1% Triton X-100 in 1X PBSに室温にて5分間浸漬します。
7. 1 mL の1X PBSで洗浄します。
8. 適切に希釈された1xPBS中の一次抗体を1 mL添加します。
9. 室温で1時間インキュベートします。
10. 1 mL の1X PBSで10分間洗浄し、更に2回繰り返します。
11. 適切に希釈された1xPBS中の二次抗体を1 mL添加します。
12. 室温で1時間インキュベートします。
13. 1 mL の1X PBSで10分間洗浄し、更に2回繰り返します。
14. 1 mL の固定化バッファーを添加します。
15. 室温で10分間インキュベートします。
16. 1 mL の1X PBSで2回洗浄します。

段階的 IF + FISH のための接着細胞株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。

ハイブリダイゼーションバッファーを含むプローブの調製には、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 (カバーガラス 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 と 5 で使用します。

1. 12-ウェルプレート中の接着細胞を含んでいるカバーガラスから、1X PBS 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分インキュベートします。
3. 加湿チャンバーを構築します: 150 mmの組織培養プレートの底部に、水を最大限に含ませたペーパータオルを平らに敷き、その上にパラフィルムを一層載せたもの。このチャンバーはカバーガラス下面からプローブ溶液が蒸発することを防ぎます。
4. 加湿チャンバー中のパラフィルムの上に、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滴下します。
5. カバーガラスの細胞が接着している面が下になるように、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の滴の上にカバーガラスを穏やかに移します。

6. 組織培養プレートの蓋で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℃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. カバーガラスの細胞が接着している面が上になるように、1 mL の Wash Buffer Aを含む新しい12ウェルプレートにカバーガラスを穏やかに移します。
9. 37℃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℃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分インキュベートします。
13. Vectashield Mounting Mediumの小滴（約15µL）をスライドグラス上に載せ、カバーガラスを細胞面が下になるようにスライドグラスに載せます。
14. カバーガラスの縁から、溢れ出た溶液をやさしく拭き取ります。
15. 透明なマニキュア液でカバーガラス周辺部を封入し、乾燥させます。
16. 必要に応じ、カバーガラス上の乾燥塩を水でやさしく拭き取ります。

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.

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 Protokolまたは以前出版されたラベリングの Protokol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 Protokol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 Protokolまたは以前出版されたラベリングの Protokol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 Protokol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 Sequential IF + FISH in Adherent Cells」(UI-207268 Rev. 1.0, Eff. Date: 13 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)