



Stellaris[®] RNA FISH

浮遊細胞のプロトコル

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
- 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)
- 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)
- Superfrost[™] Plus マイクロスライドガラス
- キムワイブ[™]
- 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 12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. 浮遊細胞のプロトコル

注: すべての遠心はテーブルトップ遠心機を用い、200 x g で 2 分間、室温にて行います。このプロトコルは Methods in Molecular Biology の Nuclear Bodies and Noncoding RNAs の Chapter 1³ を変更して作成しています。

浮遊細胞の固定化

1. 浮遊細胞 (2~5 x 10⁶ cells) を15mLコニカルチューブで遠心します。
2. 上清を吸引し、細胞をチューブ底部のペレットとして集めます。
3. 細胞を穏やかに 1mL の 1X PBSに再懸濁し、細胞懸濁液を遠心してペレットにします。
4. 1X PBSを吸引し、細胞を1mL の固定化バッファーに穏やかに再懸濁します。ピペティングまたはチューブを逆さにして良く混合します。
5. 室温で10分間インキュベートします。
6. 細胞懸濁液を遠心し、ペレットにします。固定化バッファーを吸引し、細胞を1mL の1X PBSで3回洗浄します。穏やかに上下にピペティングして良く混合し、ペレットを再懸濁します。
7. 透過化処理のため、細胞を最低1時間、+2~+8℃にて1mLの70% (vol./vol) エタノールに浸漬します。ハイブリダイゼーション前、細胞は70%エタノール中で+2~+8℃において最長1週間まで保存可能です。

浮遊細胞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 μL 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 μL 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 5 で使用します。

1. 細胞を再懸濁するために、固定・透過化した浮遊細胞を含むチューブを数回逆さにします。次いで、50~500 μL の細胞 (濃度による) をマイクロ遠心チューブに移します。もしくはこのステップで、ポリ-L-リジンまたはサイトスピンを使用し、固定・透過化済み浮遊細胞を丸型 #1カバーグラスに接着させ、この後の実験をRNA FISHの接着細胞のプロトコルに従って行うことも可能です。
2. 遠心して細胞をペレットにし、70% エタノールを吸引します。
3. 500 μL のWash Buffer A (上記の配合を参照)に細胞を穏やかに再懸濁します。
4. 遠心して細胞をペレットにし、Wash Buffer Aを吸引します。
5. プローブを含む100μLのハイブリダイゼーションバッファーに細胞を再懸濁します。上下にピペティングして良く混合します。
6. マイクロ遠心チューブを37℃の暗所にて一晩インキュベートします(最大16時間)。
7. 遠心して細胞をペレットにし、プローブを含むハイブリダイゼーションバッファーをおよそ50%吸引します。ペレットはこの時点ではとても柔らかく、容易に崩れてしまいます。
8. 500 μL のWash Buffer Aを添加します。遠心して細胞をペレットにし、溶液を吸引します。ペレットに触らないように注意してください。

9. 細胞を 500 μ L の Wash Buffer A に再懸濁します。
10. 37°C の暗所で 30 分間インキュベートします。
11. 遠心して細胞をペレットにし、Wash Buffer A を吸引します。
12. 核の対比染色のために、細胞を 500 μ L の DAPI 核染色液 (Wash Buffer A 中の 5 ng/mL DAPI) に再懸濁します。
13. 37°C の暗所で 30 分間インキュベートします。
14. 遠心して細胞をペレットにし、DAPI 核染色液を吸引します。
15. 細胞を 500 μ L の Wash Buffer B に再懸濁します。
16. 遠心して細胞をペレットにし、Wash Buffer B を吸引します。細胞を Vectashield Mounting Medium の小滴 (およそ 30 μ L) に再懸濁します。
17. 5~10 μ L の細胞懸濁液を顕微鏡用スライドガラスに滴下し、18 x 18 mm 正方形 #1 カバーガラスを細胞の上に溶液が広がるように載せます。
18. カバーガラスの上にキムワイブを一枚載せ、カバーガラスの上にやさしく圧をかけ、スライドガラスにカバーガラスをしっかりと押しつけます。細胞が変形しないよう、圧をかける間はカバーガラスを水平に動かさないように注意してください。キムワイブが余分なマウンティング液を吸い取ります。
19. 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。

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. Dunagin, M., Cabili, M.N., Rinn, J., and Raj, A. Visualization of lncRNA by single-molecule fluorescence in situ hybridization. *Nuclear Bodies and Noncoding RNAs: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. 2015; 1262: 3-19.

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 Cells in Suspension」(UI-207270 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)