



# Stellaris<sup>®</sup> RNA FISH

## 出芽酵母のプロトコル

### 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カ月までの保存が推奨されます。保存期間が1カ月を超える場合、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 】

- 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
- Nucleaseフリー水
- 脱イオン化ホルムアミド
- ソルビトール粉末
- リン酸カリウム二塩基性粉末
- エタノール (分子生物学用グレード)
- チモラーゼ
- 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)
- キムワイブ
- 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:

**1.2 M ソルビトール、0.1 M リン酸カリウム二塩基性を混合し、pH 7.5、最終容量 1Lのストックを調製します。**

218 g ソルビトール粉末 (Mw=182.17g)

17.4 g リン酸カリウム二塩基性

Nucleaseフリー水で終容量 1000 mLに調製します。

### 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 7 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. 出芽酵母のプロトコル

**注:** このプロトコルは Raj 研究室のプロトコル<sup>3</sup>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、出芽酵母に対し 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。

### 出芽酵母の固定化

1. 酵母をOD 0.2~0.4程度まで、45mLの最少培地で培養します。OD> 0.5にならないようにします。
2. 生育培地に直接5mLの37%のホルムアルデヒドを添加します。コニカルチューブを数回逆さにしながらよく混合し、45分間室温にてインキュベートします。
3. 1600 x g、4分間の遠心で酵母をスピンドウンします。
4. 1mLの氷冷した固定化バッファーに細胞を再懸濁します。1.5mLマイクロ遠心チューブに移します。
5. スピンドウンし、1 mLの氷冷した固定化バッファーで細胞を再度洗浄します。
6. 細胞を1 mL固定化バッファー+ 2.5  $\mu$ L チモラーゼに再懸濁します。位相差顕微鏡で確認したときに細胞のほとんどが暗色に変わるまで、30℃にて消化させます。注: 細胞濃度により、チモラーゼ消化は通常45~90分かかります。
7. 400 x g、5~6分の遠心で細胞をスピンドウンします。注: チモラーゼによる消化後は、1000 x g より速い遠心を行わないようにしてください。細胞壁消化のため、細胞が破裂・変形する可能性があります。
8. 細胞を氷冷した固定化バッファーで洗浄します。400 x g、5~6分の遠心で細胞をスピンドウンします。これをもう一度繰り返します。
9. 透過化処理のため、細胞を1 mLの70%エタノールに再懸濁し、+2~+8℃にて一晩保存します。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。

### 出芽酵母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  $\mu$ 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  $\mu$ 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 枚に対し十分少量)。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 2 で使用します。

1. 70%エタノール中の固定化した酵母細胞 300  $\mu$ Lを400 x gで遠心します。
2. プローブを含む100 $\mu$ L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よく混合します。
3. 30℃の暗所にて一晩インキュベートします。
4. 100  $\mu$ Lの Wash Buffer A (上記の配合を参照) をハイブリダイゼーション後の酵母細胞に添加します。400 x g で5分間遠心します。上清を注意深く吸引します (ペレットはとても柔らかく、容易に崩れてしまいます)。
5. 細胞を 1 mLの Wash Buffer A に再懸濁し、30℃の暗所で30分間インキュベートします。
6. 400 x g で5分間遠心します。

7. 核の対比染色のため、細胞を 1 mLのDAPI 核染色液 (Wash Buffer A 中の 5 ng/mL DAPI) に再懸濁し、30 °Cの暗所で30分間インキュベートします。
8. 400 x g で5分間遠心します。
9. 酵母を 1 mLのWash Buffer B に2~5分間再懸濁します。
10. 400 x g で5分間遠心します。
11. 細胞を Vectashield Mounting Medium の小滴(約15~30 µL) に再懸濁します。
12. Vectashield に懸濁した酵母細胞 5~10µLをきれいな顕微鏡用スライドガラスに載せ、液が均一に広がるよう 18 x 18 mm 正方形#1 カバーガラスを細胞の上に置きます。
13. カバーガラスの上にキムワイブを載せ、カバーガラス表面に穏やかに圧力を加え、カバーガラスをスライドガラスにしっかり押しつけます。圧を加える際、細胞が変形しないよう、カバーガラスを水平に移動させないようにしてください。キムワイブが余分なマウンティング液を吸収します。
14. 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. 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](http://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](http://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](http://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](http://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](http://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](http://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](http://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](mailto: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 *S. cerevisiae*」(UI-207271 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](http://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](mailto:reagents@primetech.co.jp)

rev01 (201803E)