


BIOSEARCH
 TECHNOLOGIES

Stellaris[®] RNA FISH

ショウジョウバエ胚のプロトコル

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。

【 胚固定化溶液 】

胚固定化溶液は、短期または長期の使用においても、室温で保存してください。

【 胚 Wash Buffer 】

胚 Wash Buffer は、短期または長期の使用においても、室温で保存してください。

【 50% 脱色液 】

脱色液は、短期または長期の使用においても、遮光して室温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)
- メタノール (分子生物学用グレード)
- 次亜塩素酸ナトリウム
- 塩化ナトリウム
- TritonX-100
- Tween-20
- 10% ホルムアルデヒド、メタノールフリー・Ultra Pure (Polysciences Cat# 04018-1 または同等品)
- ヘプタン
- エタノール (分子生物学用グレード)
- 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
- 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)
- Prolong Diamond Antifade Mountant with DAPI (Life Technologies Cat# P36962または同等品)
- RNase フリーの消耗品 (ピペットチップ等)
- 37 °Cラボラトリーオープン
- オービタルシェーカー
- Wheaton グラスバイアル (Sigma Cat # Z115053または同等品)

【 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250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. 50%脱色液:

Nucleaseフリー水と次亜塩素酸ナトリウムを1 : 1に混合します。

iii. 胚 Wash Buffer:

最終容量 1 L の場合、以下を混合します:

- 1L Nucleaseフリー水
- 6g 塩化ナトリウム
- 2mL 20% TritonX-100

iv. 胚固定化溶液:

最終容量 10mL の場合、以下を混合します:

- 0.5 mL Nucleaseフリー水
- 0.5 mL 10X Phosphate Buffered Saline (PBS), RNaseフリー
- 4 mL 10% Ultra pure ホルムアルデヒド
- 5 mL ヘプタン

v. PBT

1X PBSに 0.1% (vol./vol.) Tween-20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:

- 10 mL 1X PBS
- 10 µL Tween-20

vi. 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。

vii. 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。

viii. 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。

ix. マウンティング溶液 :

Prolong Diamond Mounting Medium with DAPI (Life Technologies #P36962)

II. ショウジョウバエ胚のプロトコル

注 : このプロトコルは Matthew Ronshaugen 博士によって提供されたプロトコル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、キロショウジョウバエに対し 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。

プロトコル注:

- ガラスWheatonバイアルとガラスピペットは、プラスチックのエッペンドルフチューブ側面に胚が付着するのを防ぐためにStellaris Wash Buffer Aとハイブリダイゼーションバッファーを用いるステップで使用します。
- 指定されない限り、溶液の交換ごとに0.5mLを使用します。

ショウジョウバエ胚の固定化

- 酵母ペーストを塗布したリング果汁寒天板上の健全なハエから卵を集めます。
- 寒天表面上に胚wash bufferを滴下し、絵筆で寒天上の胚をそっと払い、メッシュバスケットの中に入れます。胚を含む酵母の満たされた懸濁液を胚wash bufferで洗浄します。
- 胚を50%脱色液に浸漬し、定期的に脱色液を胚の上に添加しつつ1~2分間穏やかに攪拌することでビテリン膜を取り除きます。
- 微量の脱色液をすべて取り除くように、二重蒸留されたddH₂OまたはNucleaseフリー水と、胚wash bufferを用いた交互洗浄によって十分に洗浄します。ddH₂OまたはNucleaseフリー水は胚を凝集させ、胚wash bufferは胚を分離させます。最後はddH₂Oで完全に洗浄します。

5. 絵筆を用いて、胚を10mLの胚固定化溶液を含む20mLシンチレーション・バイアルへ移動します。胚は、二相の間の界面に浮きます。
6. バイアルに蓋をし、バイアル側面にテープを付けてオービタルシェーカー上に留め、~220 rpmで30分間振とうします。
7. 振とう後、界面の気泡をはじけさせます。気泡はピペットチップで破壊できます。胚を引き上げないようにしながら、ピペットで一番下の水溶性の相を完全に取り除きます。
8. 約8mLのメタノールを添加し、バイアルに蓋をして、30秒間ほど手で力強く振とうし、ベンチの上に置きます。二相が分離し、固定化されピテリン膜が除去された胚はメタノールの底部に定着します。ヘプタンの上相はそのまま、すべての破裂ピテリン膜とピテリン膜が除去されなかった胚は界面の曇った層の中にとどまります。
9. 最初にヘプタンを取り除き、次いで界面のすべての細片を取り除き、そして数ミリメートルのメタノールを残すようにして大半のメタノールを取り除きます。
10. 新しいメタノールで胚をすすぎ、ピペットを用いてメタノール中の胚を1.5mLエッペンドルフチューブに移動させます。
11. 1mLのメタノールを3回交換して胚を洗浄します。胚は-20℃のメタノール中で数年間保存可能です。

ショウジョウバエ胚のハイブリダイゼーション

1. ガラスWheatonバイアルに1染色計画あたり~50μLになるよう胚を等分します。
2. 胚をメタノールから25% PBT、50% PBT、100% PBTへと移動させます（各溶液中で5分間ずつ、室温にてローラープラットフォーム上で振とうします）。
3. PBTで10分間 x 3回振とうします。
4. PBT:Wash Buffer A が50:50の溶液中で10分間振とうします。
5. Wash Buffer Aで5分間x2回振とうします。
6. できるだけ多くのWash Buffer Aを取り除き、各バイアルに0.5mLのハイブリダイゼーションバッファーを添加して、胚を5分間定着させます。
7. 新たなハイブリダイゼーションバッファー0.5mLで置換し、37℃のウォーターバスで2時間インキュベートします。
8. バイアルあたり0.25mLのハイブリダイゼーションバッファーにプローブを50nMになるように希釈して、Stellarisプローブ混合液を調製します。
9. 胚からハイブリダイゼーションバッファーを取り除き、各バイアルに0.25mLのプローブ混合液を添加します。
10. 37℃ウォーターバス上で~14時間、暗所にてインキュベートします。
11. プローブ混合液を取り除き、0.5mLの予め温めた(37℃)ハイブリダイゼーションバッファーを添加して、37℃の暗所にて30分間インキュベートします。
12. ハイブリダイゼーションバッファーを取り除き、0.5mLの予め温めた(37℃) Wash Buffer Aで洗浄します。
13. 0.5mLの予め温めた(37℃) Wash Buffer A で15分間x3回、37℃の暗所にて洗浄します。
14. 0.5 mLのWash Buffer Aで15分間、室温の暗所にて振とうします。
15. PBTで10分間x3回、室温の暗所にて振とうします。
16. 胚をスライドガラスに等分し、アスピレーターを使用して余分なPBTを十分に除去しますが、胚を完全に乾燥させないようにしてください。
17. Prolong Diamond Antifade with DAPI を用いて胚をカバーガラスの下にマウントします。
18. スライドを平らに、室温の暗所にて24時間乾燥させます。その後直ちに撮像するか、-20℃で保存します。

References

1. Kosman D, Mizutani CM, Lemons D, Cox WG, McGinnis W, Bier E. Multiplex detection of RNA expression in *Drosophila* embryos. *Science*. 2004 Aug 6; 305(5685):846.
2. Orjalo, A. V. & Johansson, H. E. Feng, Y. & Zhang, L. (Eds.) Stellaris® RNA Fluorescence In Situ Hybridization for the Simultaneous Detection of Immature and Mature Long Noncoding RNAs in Adherent Cells Long Non-Coding RNAs: Methods and Protocols, Springer New York, 2016, 1402 119-134.

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 Drosophila Embryo」(UI-207929 Rev. 1.0, Eff. Date: 27 July 2016) 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)