



Stellaris® RNA FISH

凍結マウス脳組織のプロトコル

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)
- 20% ホルムアルデヒド (電子顕微鏡グレード)
- 10X Phosphate Buffered Saline (PBS) (RNaseフリー)
- Nucleaseフリー水
- エタノール(分子生物学用グレード)
- トリエタノールアミン
- 無水酢酸
- SSC溶液
- クロホルム
- 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)
- DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)
- Prolong® Gold Antifade Mountant (ThermoFisher Scientific Cat #P36930)
- 24 x 60 mm 長方形カバーガラス
- 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. 固定化バッファー:

1X PBS に4% (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 50mL の場合、以下を混合します :

- 10 mL 20% ホルムアルデヒド溶液
- 5 mL 10X Phosphate Buffered Saline (PBS), RNaseフリー
- 35 mL Nuclease フリー水

警告! ホルムアルデヒドは既知のヒト発癌物質ですので、化学物質換気フード内で使用してください。使用前に適切なSDS(安全データシート)を参照してください。

iii. TEA バッファー (10X):

注: このバッファーは感光性です。試薬ボトルをホイルで包むことを推奨します。

最終容量 100mL の場合、以下を混合します :

- 13.3 mL トリエタノールアミン
- 60 mL Nucleaseフリー水

次いで、HCl (~5~10 mL) を用いてpH8.0に調整し、水を加えて終容量100mLに調製します。

iv. 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。使用前に適切なSDS(安全データシート)を参照してください。

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。

v. Wash Buffer A (50 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 50 mL の場合、以下を混合します :

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

5 mL Nucleaseフリー水を添加

35 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。

vi. 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。

vii. 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。

viii. マウンティング溶液 :

Prolong Gold Antifade Mountant (ThermoFisher Scientific Cat #P36930)

注: Prolong Goldでマウントしたサンプルは室温に一晩おいて硬化させ、翌日に撮像してください。

II. 凍結マウス脳組織のプロトコル

Day 1 - スライドの準備とハイブリダイゼーション

1. スライドにマウントした組織切片を解凍し、室温に戻します。
2. スライドを冷却した4%の電顕グレード パラホルムアルデヒド in 1X PBS に15分間浸漬します。
3. 1 mL の1X PBSで5分間、2回洗浄します。
4. スライドをNucleaseフリー水に浸漬します。
5. スライドを1X TEA バッファーに浸漬します。
6. スライドを1X TEA + 無水酢酸に10分間浸漬します(攪拌します)。
注: 無水酢酸は用時添加してください。ステップ3の2回目の1X PBS洗浄の後、スライドをDEPC水に浸漬する1分程前に、無水酢酸を1X TEA バッファーに添加します。50 mLの 1X TEAに対し、63µLの無水酢酸を加えてください。
7. スライドを2X SSC に3分間浸漬します。
8. スライドを 70% エタノールに3分間浸漬します。
9. スライドを 95% エタノールに3分間浸漬します。
10. スライドを 100% エタノールに3分間浸漬します。
11. スライドを クロホルムに5分間浸漬します。
12. スライドを 100% エタノールに3分間浸漬します。
13. スライドを 95% エタノールに3分間浸漬します。
14. 90分以上空気乾燥させます (ただし4時間を超えないこと)。

凍結組織における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、4.0 µL のプローブストック溶液を 200 µL のハイブリダイゼーションバッファーに添加し、ボルテックスで混合し、遠心します。これにより 250nM の機能するプローブ溶液が調製できます。この溶液は step 16 で使用します。

15. 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。このチャンバーは組織切片からプローブ溶液が蒸発するのを防ぎます。
16. 90分以上乾燥させてスライドが乾いたら、プローブを含むハイブリダイゼーションバッファー200 µL をスライドの組織切片の上に滴下します。
17. ハイブリダイゼーション溶液が組織切片を完全にカバーして均一に分布するように、24 x 60 mmの長方形カバーガラスをハイブリダイゼーション溶液の上に載せます。スライドを加湿チャンバーの中に入れ、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。
18. 37℃の暗所にて最低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）。

Day 2 - In situ 洗浄

19. スライドを Wash Buffer Aに浸し、カバーガラスを組織切片から取り外します。カバーガラスを取り除くために穏やかに振動を加える必要があるかもしれません。
20. 37℃の暗所で30分間インキュベートします。
21. Wash buffer Aを捨て、核の対比染色のためにDAPI核染色液（Wash Buffer A 中の 5 ng/mL DAPI）を添加します。
22. 37℃の暗所で30分間インキュベートします。
23. DAPI 染色液を捨て、スライドをWash Buffer B に3分間浸漬します。
24. スライドを 50% エタノールに3分間浸漬します。
25. スライドを 85% エタノールに3分間浸漬します。
26. スライドを 100% エタノールに3分間浸漬します。
27. 5～10分間空気乾燥させます。
28. 1～2滴（およそ50～100 µL）の Prolong Gold Antifade Mountant を組織切片に滴下します。24 x 60 mm のカバーガラスを被せ、液が組織切片全体に均一に広がるようにします。
29. Prolong Goldが硬化するよう、室温の暗所に一晩置きます。
30. 透明なマニキュア液でカバーガラス周辺部を封入し、暗所で乾燥させます。
31. イメージング過程に進みます。

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 Fresh Frozen Mouse Brain Tissue」
(UI-207727 Rev. 1.0, Eff. Date: 03 Feb 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)