



# Stellaris<sup>®</sup> RNA FISH

## 凍結組織のプロトコル

### 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)
- 37%ホルムアルデヒド溶液
- 10X Phosphate Buffered Saline (PBS) (RNaseフリー)
- エタノール (分子生物学用グレード)
- 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)
- DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)
- Vectashield<sup>®</sup> Mounting Medium (Vector Laboratories Cat #H-1000)
- 24 x 60 mm 長方形 #1 カバーガラス
- RNase フリーの消耗品 (ピペットチップ等)
- 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 50mL の場合、以下を混合します :**

- 5 mL 37% ホルムアルデヒド溶液
- 5 mL 10X Phosphate Buffered Saline (PBS), RNaseフリー
- 40 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 (150 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 150 mL の場合、以下を混合します :**

- 30 mL Stellaris RNA FISH 5X Wash Buffer A (LGC Biosearch Technologies Cat# SMF-WA1-60)
  - 105 mL Nucleaseフリー水を添加
  - 15 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 9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. 凍結組織のプロトコル

**注:** 凍結組織の準備に利用される方法、例えば解剖直後の凍結、 $-80^{\circ}\text{C}$ での保存ならびにクライオスタットを利用した凍結切片の作成は、Stellaris RNA FISHの成功に寄与する主要な決定因子です。すなわち、サンプル中のRNA保存のために注意を払わなければなりません。

サンプル中のRNAの保存レベルが疑わしい場合、Stellaris RNA FISHを行う前にRNA完全性の検証を行い、お客様の実験で必ず適切なポジティブコントロールプローブセットを同時に使用するようになしてください。

## 凍結組織切片の固定化

- 凍結組織をクライオスタットで4~10 $\mu\text{m}$ の厚さにスライスし、顕微鏡用スライドグラスにマウントします。
- スライドにマウントした組織切片を室温に戻します。
- スライドを固定化バッファーに10分間、室温にて浸漬します。
- 1X PBSで2~5分間、2回洗浄します。
- 透過化処理のため、スライドを最低1時間、室温にて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、スライドは70%エタノール中で $+2^{\circ}\text{C}$ ~ $+8^{\circ}\text{C}$ において最長1週間まで保存可能です。

## 凍結組織切片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、2  $\mu\text{L}$ 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200  $\mu\text{L}$ 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. スライドにマウントした組織切片を Wash Buffer A (上記の配合を参照) に2~5分間浸漬します。
2. 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。
3. スライドを Wash Buffer Aから取り出し、組織切片周囲の余分なバッファーを注意深く拭き取ります。
4. プローブを含む200  $\mu\text{L}$ のハイブリダイゼーションバッファーをスライド上の組織切片の上に滴下します。(注: 200 $\mu\text{L}$ は24 x 60 mmの長方形 #1 カバーグラスを用いる際に推奨されます。異なるサイズのカバーグラスを使用する場合、液量を適宜調整する必要があります。)
5. 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均一に広がるように、きれいなカバーグラスをプローブを含むハイブリダイゼーション溶液の上に慎重に載せます。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。
6.  $37^{\circ}\text{C}$ 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)。
7. スライドを Wash Buffer Aに浸し、カバーグラスを組織切片から取り外します。カバーグ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。
8.  $37^{\circ}\text{C}$ の暗所で30分間インキュベートします。

9. 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。
10. 37°Cの暗所で30分間インキュベートします。
11. DAPI 染色液を捨て、スライドをWash Buffer B に2~5分間浸漬します。
12. スライドを Wash Buffer Bから取り出し、組織切片周囲の余分なバッファーを注意深く拭き取ります。
13. Vectashield Mounting Medium の小滴 (およそ50~100 µL) を組織切片の上に滴下し、きれいな #1カバーグラスを載せます。
14. カバーグラスの下から余分な液をやさしく押し出します。
15. 透明なマニキュア液でカバーグ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. Tesch, G.H., Lan, H.Y., and Nikolic-Paterson, D.J. Treatment of tissue sections for in situ hybridization. *Methods Mol. Biol.* 2006; 326 1-7.
2. 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.
3. 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](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<sup>®</sup> RNA FISH Protocol for Frozen Tissue」(UI-206657 Rev. 5.0, Eff. Date: 14 Apr 2015) を基に作成しました。  
Stellaris<sup>®</sup>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

rev01 (201803E)