

Affymetrix社

---

# ViewRNA ISH Tissue 2-Plex Assay

## ViewRNA ISH Tissue Assay 2 plex 使用方法

注：この説明書は、英文添付文書の簡易訳です。製品に添付されている英文マニュアルも必ずご確認ください。

### 内容:

商品コード	商品名	梱包単位	保存温度	輸送温度
QVT0002	ViewRNA ISH Tissue Evaluation Kit, 2 plex	1 kit	冷蔵/冷凍 /室温	冷蔵/冷凍 /室温

キット以外に必要な試薬または機器

### 試薬

- ddH<sub>2</sub>O
- 100% エタノール
- 10X PBS, pH7.2~pH7.4
- Gill's Hematoxylin I
- HistoClear
- 10%中性緩衝ホルマリン
- 27~30%Ammonium Hydroxide
- パップペン

### 備品

- Mounting medium
  - UltraMount (DAKO)
  - Histomount: UltraMount との併用時のみ使用 (Life Technologies)
  - ADVANTAGE (Innovex)
- Tissue Tek Staining Dish (3 個)
- Tissue Tek Agent Dish (1 個)
- Tissue Tek Vertical 24 Slide Rack (1 個)
- 1000mL Glass Beaker
- Cover Glass, 24mm X 55mm

### 機器

- ThermoBrite Hybridization Chamber\*
- Humidifying Strips
- Isotemp Hot Plate
- 顕微鏡

### \*ThermoBrite の代用品

- Temperature/Humidity メーター
- Tissue culture incubator (40°C, 85%以上 湿度, CO<sub>2</sub> なし)
- アルミラック (サンプル Incubation トレイ)

1. **FFPE サンプル前処理** (\*凍結切片の場合は9ページを参照)

サンプルスライドをインキュベーターにて、1時間60℃で乾燥させる(Fig. 1)。

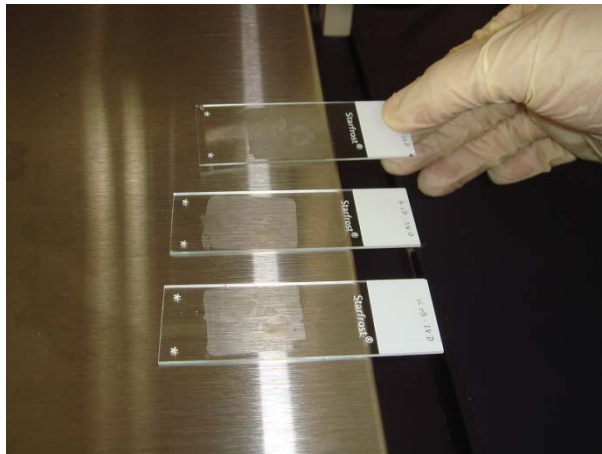


Fig.1 スライドガラスの乾燥

2. **パラフィンの除去**

80℃に設定された“ThermoBrite”(Heat block などでも可)の上で3分間インキュベートし、パラフィンを溶かす。その後、すぐに“HistoClear”に浸し、ラックを上下に動かしながら室温で5分間インキュベートする(Fig. 2)。再度、新鮮な“HistoClear”に浸し、同様に室温で5分間インキュベートする。その後2回、100%の EtOH でラックを上下に動かしながら5分間洗浄して乾かし、ポップペンで組織の周りに円を書く(Fig. 3)。

(\*パラフィン除去の操作をキシレンで行う場合は9ページを参照)

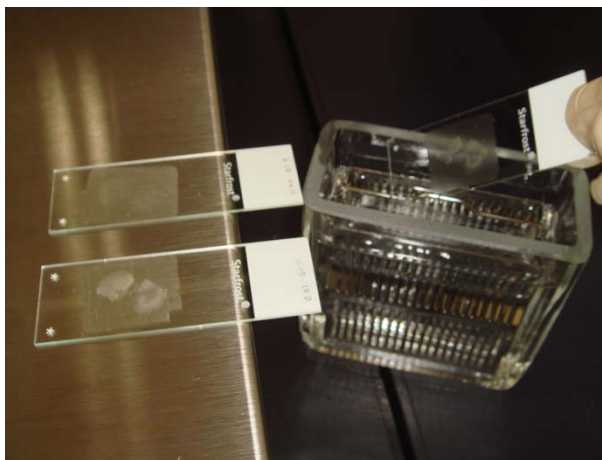


Fig.2 HistoClear でのインキュベーション



Fig.3 ポップペンで組織の周囲に円を描く

3. 最適化実験（10枚の組織切片を使い、最適なサンプルの前処理条件を検討する。Table.1を参照）

Table.1 煮沸処理と Protease 処理の最適化条件

Protease 処理時間(分)	Pretreatment 溶液での煮沸時間 (分)			
	0	5	10	20
0	スライド#1			
10		スライド#2	スライド#5	スライド#9
20		スライド#3	スライド#6 プローブ有り スライド#7 プローブ無し	スライド#10
40		スライド#4	スライド#8	

① Pretreatment 溶液での煮沸処理

サンプルを Pretreatment 溶液(1:100, 8 mL buffer + 792mL dH2O)にて、煮沸処理(90℃-95℃)する(0分、5分、10分、20分) ( Fig. 4)。その後、dH2O で洗浄する (Stop Point1 1 x PBS の中で、室温, Overnight にて保存可能)。

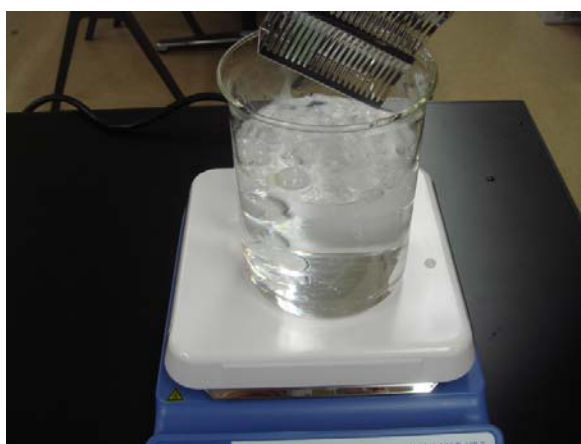


Fig.4 Pretreatment 溶液による煮沸処理

② Protease 処理

サンプルを Protease 溶液(温めた 1 x PBS を使って 1:100 に希釈)で覆い、40℃(ThermoBrite またはインキュベーターを使用)で処理する (0分、10分、20分、40分) ( Fig. 5)。



Fig.5 Protease 溶液による処理

インキュベーション後、1 x PBS で 2 回洗浄する。10%中性緩衝ホルマリンで 5 分間固定して、1 x PBS で 2 回洗浄する( Fig. 6)。



Fig.6 10%中性緩衝ホルマリンによる再固定と PBS による洗浄

4. ターゲットプローブのハイブリ

① 4L の Wash Buffer を用意する

- 3L ddH<sub>2</sub>O
- 36ml Wash Comp1
- 10ml Wash Comp2
- ddH<sub>2</sub>O to 4L

② Probe Set Diluent QT, PreAmplifier Mix QT, Amplifier Mix QT, Label Probe Diluent QF を 40℃で温める。

③ ターゲットプローブのハイブリ

ターゲットプローブ溶液、200uL をスライドの上の切片全体を覆うようにのせ(Fig. 10)、ThermoBrite またはインキュベーターにて、2 時間、40℃でインキュベーションする(ハイブリ溶液は Table.2 参照)。

Table 2 ターゲットプローブ溶液の組成

試薬	1Slide	10 Slides
Probe Set Diluent QT	190ul	1900ul
ViewRNA Type 1 Probe Set	5ul	50ul
ViewRNA Type 6 Probe Set	5ul	50ul
合計	200ul	2000ul



Fig.7 ターゲットプローブ溶液のハイブリ

④ 2分間 Wash Buffer で3回洗浄(Fig. 8)

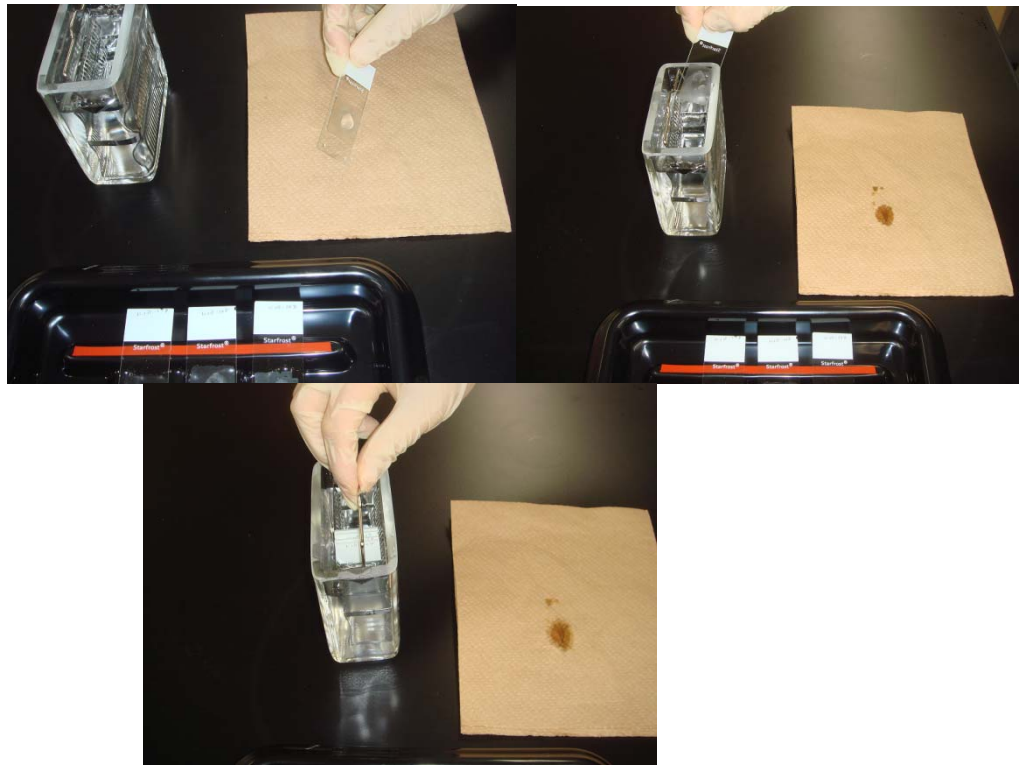


Fig.8 Wash Buffer による洗浄操作

<1日目終了ポイント>

サンプルスライドをスライドラックに入れて、200ml の Storage Buffer がはいた Tissue Tek Staining Dish の中にいれて常温で24時間保存する。2分間 Wash Buffer で2回洗浄後、Step.5 PreAmp のハイブリからスタート。

(\* Storage Buffer の組成は9ページの補足を参照)

## 5. PreAmp のハイブリ

- ① ターゲットプローブ溶液のハイブリと同様に、PreAmplifier Mix QT 200ul をスライドの上の切片全体を覆うようにのせて 25 分間、40℃でインキュベーションする。
- ② 2 分間 Wash Buffer で 3 回洗浄する。

## 6. Amp のハイブリ

- ① ターゲットプローブ溶液のハイブリと同様に、Amplifier Mix QT 200ul をスライドの上の切片全体を覆うようにのせて 15 分間 40℃でインキュベーションする。
- ② 2 分間 Wash Buffer で 3 回洗浄する。

## 7. Label Probe 6-AP ハイブリ (\*Type1/FastRed のみで染色する場合は、以下 7,8,9 のステップをスキップ)

- ① ターゲットプローブ溶液のハイブリと同様に、Label Probe 6-AP 用液 200ul をスライドの上の切片全体を覆うようにのせて 15 分間 40℃でインキュベーションする (LP-AP ハイブリ溶液は Table.3 参照)

Table. 3 Label Probe 6-AP 溶液の組成

試薬	1Slide	10 Slides
Label Probe Diluent QF	199.8ul	1998ul
Label Probe 6-AP	0.2ul	2ul
合計	200ul	2000ul

- ② 3 分間 Wash Buffer で 3 回洗浄する。

## 8. Fast Blue Substrate インキュベーション

- ① Fast Blue Substrate Substrate の調製：5ml Fast Blue Buffer へ 105 ul Blue Reagent 1 を加え vortex、105 ul Blue Reagent 2 を加え vortex、105 ul Blue Reagent 3 を加え vortex する。使用するまで遮光する。
- ② 200ul の Fast Blue Substrate をスライドの上の切片全体を覆うようにのせて、30 分間、室温、暗所でインキュベーションする。
- ③ 2 分間 Wash Buffer で 2 回洗浄する。

## 9. Label Probe 6-AP の失活

- ① 400ul の AP Stop Buffer をスライドの上の切片全体を覆うようにのせて、30 分間、室温、暗所でインキュベーションする。
- ② 1 分間 PBS で 3 回洗浄する。
- ③ Wash Buffer につけ、2-3 回ラックを上下に動かして馴染ませる。

## 10. Label Probe 1-AP ハイブリ (\*Type6/Fast Blue のみで染色する場合は、9,10,11 の①-④のステップをスキップ)

- ① ターゲットプローブ溶液のハイブリと同様に、Label Probe 1-AP 溶液 200ul をスライドの上の切片全体を覆うようにのせて 15 分間 40℃でインキュベーションする (Label Probe 1-AP は Table.4 参照)。

Table. 4 Label Probe 1-AP 溶液の組成

試薬	1Slide	10 Slides
Label Probe Diluent QF	199.8ul	1998ul
Label Probe 1-AP	0.2ul	2ul
合計	200ul	2000ul

- ② 3 分間 Wash Buffer で 3 回洗浄する。

## 11. FastRed Substrate インキュベーション

- ① 100~200ul の AP Enhancer をスライドの上の切片全体を覆うようにのせて、2-5分程度、室温でインキュベーションする
- ② ペーパータオルに AP Enhancer をデカントする
- ③ 200ul の FastRed Substrate Solution (Naphthol Buffer 5ml + 1 FastRed Tablet)をスライドの上の切片全体を覆うようにのせて 30 分間、40°Cでインキュベートする
- ④ ペーパータオルに FastRed Substrate Solution をデカントして、1 x PBS で洗浄する (ラックを上下に動かしてよく洗う(Fig. 9))。

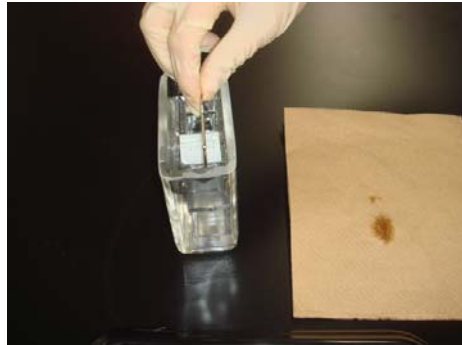


Fig.9 PBS による洗浄操作

## 12. カウンターステイン

- ① スライドを Gill's Hematoxylin が入った染色瓶に入れ、5-10 秒室温でインキュベーションする ( Fig. 10) (必要に応じてインキュベーション時間を調節する)



Fig.10 Gill's Hematoxylin による染色

- ② ddH<sub>2</sub>O にて 3 回洗浄する ( Fig.11)

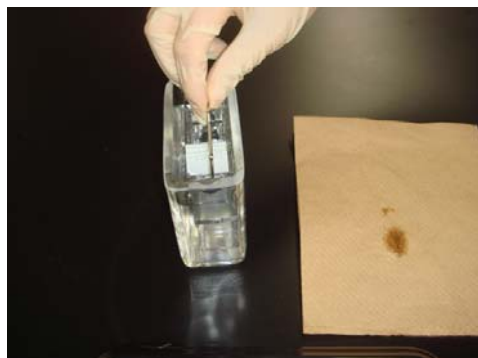


Fig.11 ddH<sub>2</sub>O による洗浄操作

- ③ 0.01%Ammonium Hydroxide に入れ、10 秒間インキュベーションする
- ④ ddH<sub>2</sub>O にて 1 回洗浄する



- ⑤ ラックからスライドを外して乾燥させる

### 13. マウントと顕微鏡観察

#### UltraMount (DAKO)を使った方法

- ・カバーガラスなしの場合（倍率：20倍またはイメージング）：
  - A. サンプル切片を平に置く
  - B. 泡を除去する為に2-3滴の UltraMount を初めに紙に垂らす
  - C. UltraMount を1滴サンプル切片の上に泡がはまらないように垂らして切片を覆う
  - D. UltraMount を乾かす為、70℃に設定されたインキュベーターにサンプル切片を平行にして置き乾くまで完全に固まるまで放置する
  - E. 顕微鏡で観察する

・マウント後にカバーガラスをする場合（倍率：20倍、40倍またはイメージング）

- A. 上記操作を行い UltraMount で固めたサンプル切片をドラフト内に持ち込む（以降の操作をドラフト内で行う）。
- B. サンプル切片が完全に固まっていることを確認する
- C. サンプル切片を室温にする
- D. 乾いた UltraMount の上に HistoMount を垂らし、カバーガラスを空気が入らないようにのせて HistoMount 液が乾くまで放置する(Fig. 12)
- E. 顕微鏡で観察する

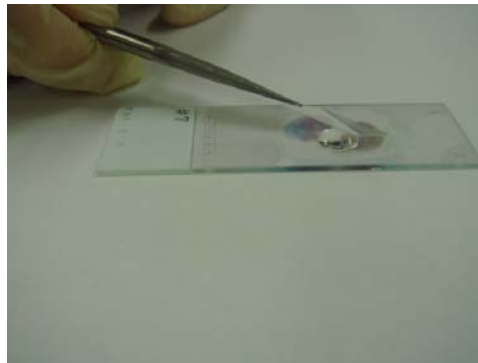


Fig.12 Mount 操作

#### ADVANTAGE (Innovex)を使った方法

- A. 平行に 24 mm x 55 mm のカバーガラスを置く
- B. 泡を除去する為に2-3滴の ADVANTAGE を初めに紙に垂らす
- C. カバーガラスの中央に ADVANTAGE を1滴垂らす
- D. チップで滴下した ADVANTAGE 液中の泡を除去する
- E. サンプル切片を斜めに傾けて、空気が入らないようにカバーガラス上の ADVANTAGE 液にゆっくり接触させ切片を覆う
- F. ケイドライ等で余分な ADVANTAGE 液をふき取る
- G. 泡の形成を防ぐため、カバーガラス周囲をマニキュアで封じる
- F. 顕微鏡で観察

補足：

\*Frozen Tissue サンプルの前処理

・組織切片の準備

OCT compound で包埋した組織ブロックを用意し、 $12 \pm 1 \mu\text{m}$  で切片を作成する(スライドガラス: positively charged 1x2 slide)

・組織切片の前処理方法

1. 冷 10%中性緩衝ホルマリンで 4℃、16-18 時間固定する
2. 1xPBS で 2 回洗浄する
3. 50%エタノール溶液中で 10 分インキュベーションする
4. 70%エタノール溶液中で 10 分インキュベーションする
5. 100%エタノール溶液中で 10 分インキュベーションする
6. 60℃で 1 時間乾燥させ、ポップペンで組織の周りに円を書く ( Fig. 3)
7. ページ 3 の最適化実験の②Proteases 処理から FFPE サンプルと同様の操作を行う。凍結切片の場合、煮沸処理は不要。

\*パラフィン除去の操作をキシレンで行われる場合

キシレンに浸し、ラックを上下に動かしながら室温で 5 分間インキュベートする。再度、新鮮なキシレンに浸し同様に室温で 5 分間インキュベートする。その後、2 回、100%の EtOH で洗浄して乾かし、ポップペンで組織の周りに円を書く。

\* Storage Buffer の組成

- ・ 200 mL Storage Buffer を用意する場合  
140 mL ddH<sub>2</sub>O  
60 mL Wash Comp 2

\*内因性アルカリフォスファターゼの失活処理方法

Protease 処理後 10%中性緩衝ホルマリン及び 1 x PBS での洗浄を 2 回行い、15 分間 0.2M HCl/300 mM NaCl でインキュベーションする。

株式会社ベリタス 〒105-0013 東京都港区浜松町1丁目10-14 住友東新橋ビル3号館5階

TEL 03-5776-0078 FAX 03-5776-0086

技術的なお問い合わせは：TEL 03-5776-0040 E-mail [techservice@veritastk.co.jp](mailto:techservice@veritastk.co.jp)



## VERITAS USER MANUAL

日本総代理店

株式会社

**ベリタス**

〒105-0013 東京都港区浜松町1丁目10-14  
住友東新橋ビル3号館5階  
TEL.03-5776-0078(代) FAX.03-5776-0076  
E-mail: veritas@veritastk.co.jp  
<http://www.veritastk.co.jp/>