

PrimeFlow RNA Assay 使用方法 (1.5 mL チューブ用)

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
TFA-88-18005-204	PrimeFlow RNA Assay	1 kit	冷蔵/冷凍 (-20℃)	冷蔵/冷凍 (-20℃)
TFA-88-18005-210	PrimeFlow RNA Assay			

プローブタイプと蛍光チャネルの選択:

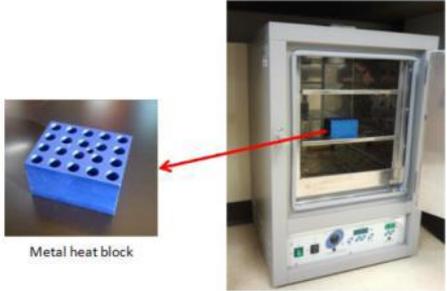
検出遺伝子の 発現量	Probe Type / 蛍光ラベル	FlowCytometer レーザー	蛍光チャネル
Low	Type 1 / Alexa Fluor 647	633	APC, AF647, eFluor 660
Low	Type 10 / Alexa Fluor 568	561	PE-eFluor 610, PE-Texas Red
Medium to High	Type 4 / Alexa Fluor 488	488	FITC, AF488
Medium to High	Type 6 / Alexa Fluor 750	633	APC-Cy7, AF750, APC-eFluor 780

必要な試薬または機器:

器具・試薬

- Flow Cytometry Staining Buffer, Thermo Fisher Scientific 社 00-4222 (Thermo Fisher Scientific 社販売)
- RNase-free 水
- (オプション) 蛍光色素標識
- (オプション) [Fixable Viability Dye](#) (Thermo Fisher Scientific 社販売)
- 12x75 mm polystyrene tubes (例: Corning社、352008)
- (オプション) 15 mL ポリプロピレン製コニカルチューブ (例: Corning社 352196)
- (オプション) 96-well, v-bottom polystyrene plate, Thermo Fisher Scientific 社 TFA-44-17005(弊社販売); 英語マニュアルのページ22「A7. Protocol using 96-well plates」をご参照下さい。
- Vortexer (例: VWR 58816-121)

機器

機器	仕様
<p>インキュベーターとheat block</p>  <p>Metal heat block</p>	<p>1. インキュベーター(validated to maintain 40 ± 1℃) 例) Thermo Fisher Scientific 社 QS0704 (弊社販売)</p> <p>2. 1.5 mLチューブ用Metal heat block 例) Metal heat block Thermo Fisher Scientific 社 13-687-210</p>
<p>低速冷却遠心機</p>  <p>Eppendorf 5810R</p> <p>Rotor with adaptor for 15-mL conical tube</p> <p>Adaptor for 1.5-mL microfuge tube</p>	<p>低速冷却遠心機 (15 mL及び、1.5 mLチューブ用のスイングバケット) 例) 低速冷却遠心機(Eppendorf, model 5810R) ローター(Eppendorf, A-4-44) 15 mLチューブ用アダプター(Eppendorf, model 5804 755.006) 1.5 mLチューブ用アダプター(Eppendorf, model 5804 750.004)</p>
<p>フローサイトメーター</p>	<p>1. 3つのレーザー, blue (488 nm)、yellow-green (561 nm)、red (633 nm or similar)</p> <p>2. 検出チャネル, FITC, PE-eFluor 610(PE-Texas Red), APC,</p>

	<p>及びAPC-eFluor 780 (APC-Cyanine7) 例) Invitrogen™ Attune™ NxT flow cytometer</p>
<p>アスピレーター</p> 	<p>アスピレーター(0.5 mL/秒に調整可能なもの) 例) 吸引ボトル (Argos Technologies, model EV432) アスピレーター(Argos Technologies, model EV514)</p>
<p>ViewRNA Temperature Validation Kit</p> 	<p>NISTトレーサブル温度計。Thermo Fisher Scientific 社 TFA-QV0523 (弊社販売)</p>

蛍光色素の適合性

1. FITC、eFluor 450、eFluor 506、eFluor 660、Alexa Fluor 700のような有機蛍光色素は本アッセイに適合性があります。BV dyesもワークすることが確認されています。
2. PE、PE-eFluor 610、PE-Cyanine5、PE-Cyanine5.5、PE-Cyanine7、APC、APC-eFluor 780を含む多くのタンパク質ベースの蛍光物質も本アッセイに適合性があります。
3. PerCP、PerCP-Cyanine5.5、PerCP-eFluor 710はご使用頂けない為、代わりにPE-Cyanine5、PE-Cyanine5.5をご使用頂くことをお勧めします。
4. Qdot® nanocrystal及びeVolvo™-結合抗体は本アッセイに適合性がありません。

実験の流れ

実験操作は、2日間に分けて実施頂けます。1日目（約6-8時間）：抗体染色、固定と膜透過処理、ターゲットプローブのハイブリ、2日目（約6時間）：シグナル増幅、解析となります。

1.5 mL チューブでの操作方法：

I. Day1: 抗体染色、固定、膜透過処理

【注：ターゲットプローブのハイブリの操作以降、キットに付属の1.5 mLチューブを必ず使用して下さい!! 抗体染色、固定、膜透過処理はバルクでの操作が可能で、使用するチューブの指定はございません。バルクで操作する場合、 1×10^7 cells/mLの濃度を超えないようにして下さい】

1. Wash Bufferを室温に戻す。Wash BufferはStep.14ではじめて使用される
【注：稀に結晶などが析出する場合がございますが、品質上問題はございません。室温に戻して使用下さい（その日に使用する量を分注し、遠心し除去することも可能）】
2. Flow Cytometry Staining Bufferで懸濁した $1-5 \times 10^6$ cells又は、100 uLの全血をキットに付属の1.5 mLチューブに移す

【注：全血を使用する場合、アッセイを始める前に赤血球の溶血は必要ありませんが、溶血を希望する場合、[10X RBC Lysis Buffer \(cat. 00-4300-54\)](#) の使用を推奨します。10X RBC Lysis Buffer の使用方法は、製品資料又は、[Best Protocols: Red Blood Cell Lysis Protocol, Protocol A](#) をご参照下さい】

3. PrimeFlow Compensation Kit及び、実験で使用する抗体を使用し、single-color compensation control サンプルを調製する。詳細は、英語マニュアルのAppendix 3を参照下さい。調整したcompensation control サンプルはIC Fixation Bufferで5日間まで、暗所2-8°Cで保存可能
4. 最適な濃度の蛍光色素標識抗体で30分間、2-8°Cで表面抗原染色する【注：表面抗原染色について、[Best Protocols: Staining Cell Surface Antigens for Flow Cytometry: Protocol A: Cell Suspensions](#) をご参照下さい。ご使用可能な蛍光色素について、上記：蛍光色素の適合性を確認下さい。また、細胞の生死判定用色素 *Fixable Viability Dye*での染色は表面抗原染色の前又は後に実施頂けます(マニュアルは[Best Protocols: Viability Staining Protocol, Protocol C](#) をご参考下さい)。固定されたエピトープを認識する抗体クローンでの染色は、固定と膜透過処理後に行われる。Thermo Fisher Scientific 社Webサイト：[Antibody Clone Performance Following Fixation/Permeabilization](#) のテーブル中、*After IC Fixation and Perm Wash*カラムを抗体選択の参考にして下さい。固定後に染色を希望される場合、このステップをスキップしStep.5に進んで下さい】
5. 各サンプルに1mLのFlow Cytometry Staining Bufferを加え、転倒混和し500 x g、5分間、2-8°Cでスピンドウンする。100 uLの液量を残し上清を除去し、残った液で細胞を懸濁する
【注：全血を使用する場合、このステップをスキップしStep.6に進んで下さい】
6. Fixation Buffer 1A及びFixation Buffer 1Bを等量転倒混和で穏やかに混ぜ、Fixation Buffer 1を調製する【注：1サンプルにつき1mL調製。このバッファーをVortexしたり、激しくシェイクしたりしないで下さい】
7. 調製した1mL のFixation Bufferを各サンプルに加え、転倒混和で混ぜ30分間、2-8°Cでインキュベーションする
8. 800 x g、5分間、2-8°Cスピンドウンし、100 uLの液量を残し上清を除去し、残った液で細胞を懸濁する
9. Permeabilization Buffer (10X)をRNase-free 水で1Xに希釈し、RNase Inhibitors (100X)を1/100希釈になるように加え、1 X Permeabilization Buffer with RNase Inhibitorsを調製する【注：1サンプルにつき3mL調製。また、このバッファーをVortexしたり、激しくシェイクしたりしないで下さい】
10. 1mL の1X Permeabilization Buffer with RNase Inhibitorsを各サンプルに加え、転倒混和し800 x g、5分間、2-8°Cでスピンドウンする。100 uLの液量を残し上清を除去し、残った液で細胞を懸濁する
11. 1 X Permeabilization Buffer with RNase Inhibitorsで再洗浄する
12. 最適な濃度の蛍光色素標識抗体で30分間、2-8°Cで細胞内染色する【注：細胞内染色をしない場合は、このステップをスキップしStep.14に進んで下さい。固定されたエピトープを認識する抗体クローンでの染色は、固定と膜透過処理後に行われます。eBioscience社Webサイト：[Antibody Clone Performance Following Fixation/Permeabilization](#) のテーブル中、*After IC Fixation and Perm Wash*カラムを抗体選択の参考にして下さい。ご使用可能な蛍光色素について、上記：蛍光色素の適合性を確認下さい】
13. 1mL の1X Permeabilization Buffer with RNase Inhibitorsを各サンプルに加え、転倒混和し800 x g、5分間、2-8°Cでスピンドウンする。100 uLの液量を残し上清を除去し、残った液で細胞を懸濁する
14. 1サンプルにつき125 µLのFixation Buffer 2 (8X)と875 µLのWash Bufferを転倒混和で穏やかに混ぜ、1X Fixation Buffer 2を調製する【注：1サンプルにつき1mL調製。このバッファーをVortexしたり、激しくシェイクしたりしないで下さい】
15. 1mL の1X Fixation Buffer 2を各サンプルに加え、転倒混和で混ぜ60分間、室温暗所でインキュベーションする【注：室温でサンプルを固定することが重要です。氷上でのインキュベーションは避けて下さい】
16. 【オプション】細胞は1X Fixation Buffer 2中、暗所2-8°C overnightで保存が可能(overnightで保存する場合、Step 15をスキップ)。
17. 800 x g、5分間、室温でスピンドウンする。100 uLの液量を残し上清を除去し、残った液で細胞を懸濁する【注：抗体染色、固定、膜透過処理をバルクの操作で行っていた場合、下記の洗浄操作の間に細胞をキットに付属の1.5 mLチューブに移し替えて下さい】
18. 各サンプルに1 mLのWash Bufferを加え、転倒混和し800 x g、5分間、室温でスピンドウンする。上清を除去し100 uLの液量を残し上清を除去し、残った液で細胞を懸濁する

19. Wash Bufferで再洗浄する【注：キットに付属の1.5 mLチューブの目盛を利用して、残りの液を100uLに調製】
20. 【オプション】細胞は100 uLのWash Buffer with RNase Inhibitors中、暗所2-8°C overnightで保存が可能(*Wash Buffer with RNase InhibitorsはWash BufferにRNase Inhibitors(100X)を1/100希釈になるように加え調製し、Step.19で使用する。【注：このバッファーは1サンプルにつき1mL調製】)。

II. Day1: ターゲットプローブのハイブリ

【注：すべての洗浄後、キットに付属の1.5 mLチューブの目盛を利用して、サンプル溶液を100uLに調製して下さい。希釈したターゲットプローブは100uLのサンプル溶液に直接(チップの先をサンプル溶液に付けて)加え、サンプルを良く混ぜて下さい。チップの先がサンプル溶液に付かない状態で加えるのは避けて下さい】

21. ターゲットプローブ(20X)を室温で解凍する
22. Target Probe Diluentを40°Cで温める
23. プローブをTarget probe Diluentで1/20倍希釈する【注：希釈プローブは1サンプルにつき100 uL調製】
24. 100 uLの希釈したプローブをサンプルに加え、穏やかにVortexし細胞を懸濁。インキュベーター内のヒートブロックにチューブを置く。2時間、40°Cでインキュベーション。インキュベーション開始から1時間後に転倒混和。



25. 各サンプルに1 mLのWash bufferを加え、転倒混和で混ぜる。800 x g、5分間、室温でスピンドウンし、100 uLの液量を残し上清を除去。
26. Wash Buffer にRNase Inhibitors(100X)を1/100希釈になるように加えWash Buffer with RNase Inhibitorsを調製する【注：このバッファーは1サンプルにつき1mL調製】
27. 各サンプルに1 mL のWash Buffer with RNase Inhibitorsを加え、転倒混和で混ぜる。800 x g、5分間、室温でスピンドウンし、100 uLの液量を残し上清を除去。
28. サンプルを暗所2-8°C overnightで保存
【注：1日目の終了ポイント：簡便に利用して頂く為に、1日目をここでストップして頂くのがお薦めです。Step.28をスキップする場合は、Step.29に進んで下さい】

III. Day2: シグナルの増幅と検出

【注：すべての洗浄後、キットに付属の1.5 mLチューブの目盛を利用して、サンプル溶液を100uLに調製して下さい。PreAmp Mix、Amp Mix、希釈したLabel Probesは100uLのサンプル溶液に直接(チップの先をサンプル溶液に付けて)加え、サンプルを良く混ぜて下さい。チップの先がサンプル溶液に付かない状態で加えるのは避けて下さい】

29. Wash Buffer、サンプルを室温にもどす
【注：稀に結晶などが析出する場合がございますが、品質上問題はございません。室温に戻して使用下さい (*その日に使用する量を分注し、遠心し除去することも可能)】
30. PreAmp Mix、Amp Mix、Label Probe Diluentを40°Cで温める
31. Label Probesを暗所、氷上で解凍する
【注：本ステップはStep.35のAmp Mixのインキュベーション中に実施】

32. 各サンプルに100 uL のPreAmp Mixを加え、穏やかにVortexで細胞を懸濁する。インキュベーター内のヒートブロックにサンプルを置く。1時間30分、40°Cでインキュベーション。
33. サンプルを取り出し、各サンプルに1 mLのWash Bufferを加え、転倒混和。5分間、800 x g、室温でスピンドウンし、100 uLの液量を残し上清を除去
34. Repeat wash : Wash Buffer で2回洗浄する (計3回洗浄)
35. 各サンプルに100 uLのAmp Mixを加え、穏やかにVortexし細胞を懸濁する。インキュベーター内のヒートブロックにチューブを置く。1時間30分、40°Cでインキュベーション
36. 各サンプルに1 mLのWash Bufferを加え、転倒混和。5分間、800 x g、室温でスピンドウンし、100 uLの液量を残し上清を除去
37. Repeat wash : Wash Buffer で1回洗浄する
38. Label Probes(100X)をLabel probe Diluentで1/100倍希釈する【注：希釈Label Probesは1サンプルにつき100 uL調製】
39. 各サンプルに100 uLの希釈したLabel probeを加え、穏やかにVortexし細胞を懸濁する。インキュベーター内のヒートブロックにチューブを置く。1時間、40°Cでインキュベーション
40. 各サンプルに1 mLのWash Bufferを加え、転倒混和。5分間、800 x g、室温でスピンドウンし、100 uLの液量を残し上清を除去
41. Repeat wash : Wash Buffer で1回洗浄する
42. 各サンプルに1 mLのStorage Buffer又はFlow Cytometry Staining Bufferを加え、転倒混和。5分間、800 x g、室温でスピンドウンし、100 uLの液量を残し上清を除去。100uLのサンプルを約100uL Storage Buffer又はFlow Cytometry Staining Bufferのに入った12x75 mm polystyrene tubeに移し、Flow cytometerで解析。【注：染色したサンプルは解析前に、暗所2-8°Cで3日間保存可能。また染色したサンプルの保存は100uLの細胞に、100uLのIC Fixation Bufferで混ぜて保存することをお勧めします】

注意事項

- 各ステップのVortexは穏やかに実施下さい
- 各ステップで調製するバッファーは用事調整し、Freshなものをご使用下さい
- アッセイパフォーマンスを確保する為にExperimental Design Guidelinesをご確認下さい
- 正常細胞をご使用下さい

ご検討される際の細胞は健康な正常細胞をご使用下さい。浮遊系のセルラインの場合、指数関数的な増殖期の細胞を推奨します。コンフルエントまたは、overly concentrated cellsは使用しないで下さい。不健康な細胞は、実験での細胞処理中にCell Lysisの影響を受けやすく細胞の減少に繋がります。

- 全血サンプルを使用する場合はご注意ください

赤血球溶血の操作は必要ございませんが、アッセイ後、FSC/SSCドットプロットで細胞のプロット(顆粒球など)が変化したり、アッセイ中に溶血した赤血球等のdebrisが存在したりする為、見られたい細胞ポピュレーションを識別する為に抗体染色(CD45抗体など)と組み合わせてアッセイを行って下さい。

- 低速冷却遠心機(バケットタイプ)をご使用下さい

細胞ロスを避けるため、バケットタイプの遠心機のご使用を推奨します。

- Metal heat blockを使ってincubator (40°C±1)の温度確認下さい

実験の前に、インキュベーター内に1.5 mLチューブがセット可能なmetal heat blockを入れ、40°Cで一定になるよう、Thermometerでチューブ内の温度を確認下さい。確認方法の詳細は、英語マニュアルのページ19「A6. Temperature Validation Procedure for Incubator」をご参照下さい。

- アッセイで使用する試薬はサンプル溶液中に直接加えて下さい

Target Probe, PreAmp, Amp and Label Probe溶液をサンプルに加える際、100 uLのサンプル溶液中に直接(チップの先をサンプル溶液に付けて)各試薬を加え、Vortexで細胞をよく懸濁して下さい。チップの先をチューブの壁に付け、各試薬を添加するのは避けて下さい。

- アッセイではポジティブコントロールを置いて下さい

常にアッセイでは、ヒト用にRPL13A、マウス用にACTBのようなポジティブコントロールプローブを加えてアッセイを行ってください。英語マニュアルのページ20「A5. Validated Cells and Recommended Positive Control Genes」をご参照下さい。

● 同じ蛍光色素で適したコンペーンション用のコントロールをセットアップして下さい

コンペーンションのセットアップの為に、Type 1,4,6,10のハウスキーピング遺伝子のプローブでサンプルを単染色することを推奨します。同様の励起/発光特性でも他の蛍光色素は使用しないで下さい。例えば、APCをType 1 probes (Alexa Fluor 647)用に使用しないで下さい。

● フローサイトメーターが仕様に合っていて、良い動作条件であるか確認下さい

キャリブレーションビーズ(e.g. Spherotech cat. no. URCP URCP - 38 - 2K)を使用して、laser alignmentの確認をして下さい。

mRNA(4色同時染色)を測定する場合は、3つのレーザー：blue (488 nm)、yellow-green (561 nm)、red (633-640 nm)と、FITC、PE-eFluor 610、APC、APC-Cy7のフィルターが必要です。詳細は、英語マニュアルのページ2「General notes」、ページ13「A3. Cytometer Setup and compensation」をご参照下さい。

● プローブタイプと蛍光チャネルの選択について

Type 1/650 probe set製品は、Type 10/568、Type 4/488、Type 6/750 probe setsと比べて最も感度が高いです。特にType 1/650 channelは、他の2つ(Type 4/488、Type 6/750)のchannel より2-5倍程度感度が高いです。低・中・高発現遺伝子それぞれに対して、下記表のprobe type/FlowCytometerレーザー/蛍光チャネルを使用することを推奨します。加えて、Type 4/488 channelは、バックグラウンドの蛍光が他の3つのchannelと比べて高いです。

検出遺伝子の発現量	Probe Type / 蛍光ラベル	FlowCytometer レーザー	蛍光チャネル
Low	Type 1 / Alexa Fluor 647	633	APC, AF647, eFluor 660
Low	Type 10 / Alexa Fluor 568	561	PE-eFluor 610, PE-Texas Red
Medium to High	Type 4 / Alexa Fluor 488	488	FITC, AF488
Medium to High	Type 6 / Alexa Fluor 750	633	APC-Cy7, AF750, APC-eFluor 780

● mRNAを4色同時染色の際のサンプルの準備例：

Compensation controlにはご自身のサンプルに各Typeのプローブを加えて下さい。No staining及びCompensation controlで適切なPMT voltage及びコンペーンションを設定後、Sample(4-color)を測定下さい。

*もしmRNA検出と同時に抗体染色を行う場合、初めに単染色でのご検討をお願いします。また抗体染色の場合、コンペーンション用のコントロールが必要ですので、一度お問い合わせ下さい。また英語マニュアルのページ16「A4: Examples of expected results」もご参考下さい。

	No staining	Red compensation control	Green compensation control	InfraRed compensation control	Yellow compensation control	Sample 4-color
Type 1 probe		○				○
Type 4 probe			○			○
Type 6 probe				○		○
Type 10 probe					○	○

株式会社バリタス 〒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 03-5776-0076

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