

RNAscope[®] 多通道二代荧光试剂盒 用户手册

文件编号 **323100-USM**

第 1 部分, 《FFPE 组织样品制备及预处理指南》, 请参阅文件编号 **322452-USM**。

仅供研究用途 (RUO)，不用于诊断

商标

RNAscope® 和 HybEZ™均为 Advanced Cell Diagnostics, Inc. 的商标。其他所有商标均归其各自持有者。

在出版物中引用 RNAscope®

在公开出版物中描述使用本产品的实验流程时，请称其为 RNAscope® 检测，并引用：Wang F, Flanagan J, Su N, Wang L-C, Bui S, Nielson A, Wu X, Vo H-T, Ma X-J and Luo Y. RNAscope®:A Novel In Situ RNA Analysis Platform for Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissues.J. Mol.Diagnostics, 2012, 14:22-29。

免责声明

Advanced Cell Diagnostics, Inc. 保留根据技术发展随时更改其产品和服务的权利。本用户使用说明书如有变更，恕不另行通知。尽管本使用说明书已尽最大可能确保准确性，但对于因使用本使用说明书导致的任何错误、疏忽或损失，Advanced Cell Diagnostics, Inc. 不承担责任。

版权

© 2018, Advanced Cell Diagnostics, Inc. 保留所有权利。

目 录

第 1 章 产品信息	5
关于本指南	5
产品说明	5
背景	5
概述	5
试剂盒组成与储存条件	6
RNAscope® 探针	6
RNAscope® 多通道二代荧光试剂盒	7
所需材料和设备	8
HybEZ™ 杂交系统	8
TSA® Plus 荧光基团或 Opal™染料	8
用户自备材料	9
荧光成像建议	9
第 2 章 开始之前	10
重要流程指南	10
第 3 章 样本制备与预处理	11
福尔马林固定石蜡包埋切片样本制备与预处理	11
工作流程	11
所需材料	12
制备 FFPE 组织切片	12
烤片	13
FFPE 切片脱蜡	13
准备预处理所需材料和仪器	13
RNAscope® 双氧水处理	14
RNAscope® 靶标修复试剂处理	14
画疏水圈	14
RNAscope® 蛋白酶 Plus 处理	15
进行 RNAscope® 检测	15
固定后冰冻组织切片样本制备与预处理	16
工作流程	16
所需材料	17
固定样本	17
冰冻组织包埋	17
制备冰冻组织切片	18
准备预处理所需材料和仪器	18
RNAscope® 双氧水处理	19
RNAscope® 靶标修复试剂处理	19
画疏水圈	19
RNAscope® 蛋白酶 III 处理	20
进行 RNAscope® 检测	20
新鲜冰冻组织切片样本制备及预处理	21
工作流程	21
所需材料	22

制备新鲜冰冻组织切片	22
切片固定	23
切片脱水	23
画疏水圈	23
RNAscope® 双氧水处理	24
RNAscope® 蛋白酶 IV 处理	24
进行 RNAscope® 检测	24
第 4 章 RNAscope® 多通道二代荧光检测	25
工作流程	25
检测所需的材料	26
准备材料	26
制备 1× 清洗缓冲液	26
准备探针	26
平衡试剂	27
进行 RNAscope® 二代荧光检测	27
探针杂交	27
杂交 AMP 1	28
杂交 AMP 2	28
杂交 AMP3	28
准备 TSA®Plus 荧光染料	29
C1 通道探针的信号标记	29
C2 通道探针的信号标记	30
C3 通道探针的信号标记	30
复染和封片	31
第 5 章 检测结果分析	32
荧光成像的建议	32
检测结果分析	32
对照示例	33
疑难解答	34
附录 A 组织预处理推荐条件	35
组织预处理推荐条件	35
组织特异性预处理条件	36
附录 B 试剂用量指南	37
确定试剂用量	37
附录 C 安全性	38
化学品安全性	38
生物危害安全性	38
在美国：	38
在欧盟：	38
文档与支持	39
获取 SDS	39
获取支持	39
联系信息	39
有限产品质保	39

1



使用本产品前，请阅读并理解第 38 页附录 C 安全性上的信息。

重要！ 我们建议您在开始任何操作之前，先完整阅读本用户手册。如有需要，请随时联系技术支持。

关于本指南

本用户手册提供关于在 FFPE 切片、固定后冰冻切片和新鲜冰冻切片上使用 RNAscope® 多通道二代荧光试剂盒（货号 323100）的指南和操作规程。

产品说明

背景

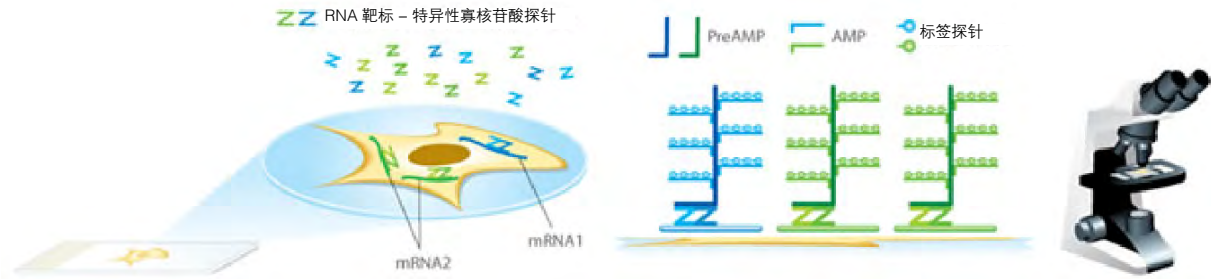
RNAscope® 多通道二代荧光检测采用创新的专利原位杂交（ISH）方法，在固定于载玻片上的切片和细胞样本中能同时可视化检测多达三种不同的 RNA 靶标（试剂盒货号 323100）。在配合使用 RNAscope® 多通道二代荧光检测配套试剂盒（货号 323120）以及对应的种属特异性四重荧光对照探针的情况下，更可同时可视化检测四种不同的 RNA 靶标。该检测方法基于 ACD 专利的信号放大和背景抑制技术，并整合了额外的信号放大系统，从而能够在组织和细胞层面研究多个基因之间的表达和分布关系。

概述

RNAscope® 多通道二代荧光检测流程如第 6 页的图 1 所示。整个操作流程可以在约 9 小时内完成，或方便地分成两天完成。大部分的 RNAscope® 试剂均以方便的即用型（RTU）滴瓶形式提供，操作流程很简单，几乎不需要使用移液枪。

首先组织切片经过适当的预处理，然后使用 ACD 专利的、针对不同靶标设计的特异性寡核苷酸探针与目标 RNA 杂交。经过逐级、特异的信号放大后，不同的目标基因 RNA 在不同荧光通道中显示为点状信号。使用配备了合适滤光片的荧光显微镜就可以观察这些点状信号。

图 1 工作流程概述



1: 组织切片	2: 与 RNA 靶标杂交	3: 信号放大	4: 图像
使用预处理试剂处理切片，以暴露靶标 RNA。	将基因特异性的探针与目标 RNA 杂交。	探针与级联放大信号分子杂交，多达四套独立信号放大系统来检测多个 RNA 靶标。最终在不同的荧光通道中显示不同靶标 RNA。	使用合适的荧光显微镜观察靶标 RNA。

试剂盒组成与储存条件

RNAscope® 多通道二代荧光检测需要 RNAscope® 探针和 RNAscope® 多通道二代荧光试剂盒（货号 323100）。探针和试剂盒可分开购买。

RNAscope® 探针

RNAscope® 探针包括用户特异性靶标探针以及阳性和阴性对照探针。访问网站 www.acdbio.com/products/target-probes/search-product，搜索您所需的基因特异性靶标探针，您也可以定制特异性靶标探针。RNAscope® 探针是能够与特异性的靶标 RNA 结合的短寡核苷酸探针混合物。当要同时检测多个靶标并以不同颜色呈现的时候，需要不同 RNA 靶标的 RNAscope® 探针位于不同探针通道。使用 TSA® Plus 荧光基团或 Opal™ 荧光染料，可以将 C1、C2 和 C3 通道的 RNAscope® 探针标记上不同的荧光。每瓶探针足以用于染色约 20 个面积约为 20 mm × 20 mm（0.75” × 0.75”）的切片。当检测的组织切片较大时，每支探针所能完成的实验次数会相应减少。按照下表中条件保存，探针的保质期为两年（从生产日期开始计算）：

目标探针					
☒	试剂	货号	描述	数量	储存条件
	目标探针 – [种属] – [基因]	多种	C1 通道的即用型（RTU）探针	3mL × 1 瓶	2–8° C
	目标探针 – [种属] – [基因] – C2	多种	50X 的 C2 通道探针	60 μ L × 1 管	2–8° C
	目标探针 – [种属] – [基因] – C3	多种	50X 的 C3 通道探针	60 μ L × 1 管	2–8° C
对照探针					
☒	试剂	货号	描述	数量	储存条件
	三通道阳性对照探针	多种	C1 通道针对 POLR2A，C2 通道针对 PPIB，C3 通道针对 UBC 的三种探针的即用型混合探针。	3mL × 1 瓶	2–8° C
	三通道阴性对照探针	320871	针对细菌基因 dapB 的即用型探针。每个检测通道都有针对 dapB 的探针。	3mL × 1 瓶	2–8° C
	探针稀释液	300041	探针稀释液	3mL × 1 瓶	2–8° C

RNAscope® 多通道二代荧光试剂盒

每个 RNAscope® 多通道二代荧光试剂盒（货号 323100）提供足够的试剂用于约 20 个面积约为 20 mm × 20 mm（0.75” × 0.75”）的组织切片 RNAscope® 检测。组织切片较大时，每个试剂盒所能完成的检测数会相应减少。每个试剂盒包括以下子试剂盒：RNAscope® 预处理试剂盒、RNAscope® 多通道二代荧光检测试剂盒、RNAscope® 清洗缓冲液试剂盒。

根据下表的条件保存，试剂盒有效期见试剂盒上的标识。

预处理试剂盒（货号 322381 和 322000）			
☒	试剂	数量	储存条件
	RNAscope® 双氧水	4 mL × 2 瓶	2–8° C
	RNAscope® 蛋白酶 III	4.5 mL × 2 瓶	2–8° C
	RNAscope® 蛋白酶 Plus	4.5 mL × 2 瓶	2–8° C
	RNAscope® 蛋白酶 IV*	4.5 mL × 2 瓶	2–8° C
	RNAscope® 靶标修复试剂	70 mL × 4 瓶	室温（15–30° C）
RNAscope® 多通道二代荧光检测试剂盒（货号 323110）			
☒	试剂	数量	储存条件
	RNAscope® 多通道二代荧光 AMP 1	3 mL × 1 瓶	2–8° C
	RNAscope® 多通道二代荧光 AMP 2	3 mL × 1 瓶	2–8° C
	RNAscope® 多通道二代荧光 AMP 3	4.5 mL × 1 瓶	2–8° C
	RNAscope® 多通道二代荧光 HRP–C1	4.5 mL × 1 瓶	2–8° C
	RNAscope® 多通道二代荧光 HRP–C2	4.5 mL × 1 瓶	2–8° C
	RNAscope® 多通道二代荧光 HRP–C3	4.5 mL × 1 瓶	2–8° C
	RNAscope® 多通道二代荧光 HRP 阻断剂	4.5 mL × 3 瓶	2–8° C
	RNAscope® 多通道二代荧光 DAPI	3 mL × 1 瓶	2–8° C
	RNAscope® TSA 稀释液	29 mL × 1 瓶	2–8° C
RNAscope® 清洗缓冲液试剂盒（货号 310091）			
☒	试剂	数量	储存条件
	RNAscope® 50 × 清洗缓冲液	60 mL × 4 瓶	室温（15–30° C）

重要！ RNAscope® 试剂盒有相同的预处理试剂盒及清洗缓冲液试剂盒，但检测试剂盒不同。即使名称相同，请勿互换不同 RNAscope® 检测试剂盒中的成分。

所需材料和设备

进行 RNAscope® 检测需要以下材料和设备。

HybEZ™ 杂交系统

重要！ 该系统是经 ACD 验证的唯一可以用于 RNAscope® 检测的系统。

HybEZ™ 杂交系统(110V, 货号 310010; 220V, 货号 310013)专为 RNAscope® 检测中的杂交和孵育步骤设计。

这些步骤必须在湿润的条件下进行，以防止切片干燥。

HybEZ™ 杂交系统的使用方法，请参考《HybEZ™ 杂交系统用户使用说明书》：<http://www.acdbio.com/documents/support-documents>，或观看培训视频：<http://www.acdbio.com/Technical-support/learn-more>。HybEZ™ 杂交系统包含以下组件：

☒	组件	数量	货号
	HybEZ™ 杂交炉（110 或 220 V）	1 个	310010 或 310013
	HybEZ™ 湿盒	1 个	310012
	EZ-Batch™ 系统（包含 EZ-Batch™ 载玻片夹和 EZ-Batch™ 清洗槽）	1 套	310007
	HybEZ™ 吸水纸	2 张	—
	HybEZ™ 吸水纸包	15 张	310015

TSA® Plus 荧光基团或 Opal™ 染料

RNAscope® 多通道二代荧光试剂盒需配套使用 PerkinElmer 公司的 TSA® Plus 荧光染料或 Opal™ FIHC 试剂盒（详见下表）。请使用 RNAscope® 多通道二代荧光试剂盒提供的 RNAscope® TSA 稀释液来稀释 TSA® Plus 荧光染料或 Opal™ 荧光染料。参考 ACD 的建议和您的需求（例如组织质量或显微镜配置），选择每个荧光染料的稀释范围。对于以下三个荧光染料，ACD 均进行了 1：1500 稀释的验证。如果您使用其它的荧光染料，我们不能保证检测结果。

荧光染料	产品货号（PerkinElmer）	建议稀释范围
PerkinElmer TSA® Plus Fluorescein	NEL741E001KT* 或 NEL741001KT†	1:750–1:3000
PerkinElmer TSA® Plus Cy3	NEL744E001KT* 或 NEL744001KT†	1:750–1:3000
PerkinElmer TSA® Plus Cy5	NEL745E001KT* 或 NEL745001KT†	1:750–1:3000

* 根据所使用的稀释倍数，该试剂规格（300 μL）足以对 750–3000 张载玻片进行实验检测。更多的规格选择可访问 PerkinElmer 公司网站。

† 根据所使用的稀释倍数，该试剂规格（150 μL）足以对 375–1500 张载玻片进行实验检测。更多的规格选择可访问 PerkinElmer 公司网站。

您可以用 PerkinElmer 公司的 Opal™ 染料替代 TSA® Plus 荧光染料。

荧光基团	产品货号（PerkinElmer）	建议稀释范围
Opal 520	FP1487001KT：Opal™ 520 Reagent pack*	1:750–1:3000
Opal 570	FP1488001KT：Opal™ 570 Reagent pack*	1:750–1:3000
Opal 670	FP1496001KT：Opal™ 650 Reagent Pack*	1:750–1:3000
Opal 690	FP1497001KT：Opal™ 690 Reagent Pack*	1:750–1:3000

* 根据所使用的稀释倍数，该试剂规格（150 μL）足以对 375–1500 张载玻片进行实验检测。

用户自备材料

☒	名称	供应商	货号
	ProLong Gold 防淬灭封片剂	Invitrogen	P36930
	Tissue-Tek® 24 位垂直载玻片架	American Master Tech Scientific/MLS*	LWSRA24
	Tissue-Tek® 染色皿	American Master Tech Scientific/MLS	LWT4457EA
	盖玻片	Fisher Scientific/MLS	12–545–F
	玻璃瓶（>3L）	MLS	—
	水浴箱或恒温箱，可将温度保持在 40 +/- 1° C	MLS	—
	蒸馏水	MLS	—
	移液管（多尺寸）	MLS	—
	纸巾或吸水纸	MLS	—
	荧光显微镜，滤光片设定（详见下表）： Ex Max 358 nm/Em Max 461 nm（DAPI） Ex Max 494 nm/Em Max 517 nm（FITC） Ex Max 550 nm/Em Max 570 nm（Cy3） Ex Max 648 nm/Em Max 667 nm（Cy5）	MLS	—

* 北美的主要实验室供应商。对于其它地区，请联系当地的实验室供应商咨询货号。

荧光成像建议

显微镜	物镜	图像
➤ Leica DM 系列或等效产品 ➤ Zeiss Axio 成像系统或等效产品 ➤ 如果光学元件和聚光器符合要求，倒置显微镜也可以接受 ➤ 需要激发 / 发射滤光片设置：DAPI / FITC / Cy3 / Cy5	➤ 20×（N.A.0.75）干式物镜 ➤ 40×（N.A.0.8）干式物镜（推荐） ➤ 40×（N.A.1.3）油浸物镜 ➤ 63×（N.A.1.3）油浸物镜 – 可用于低表达的 RNA 靶标 ➤ 20× 和 40× 物镜可分别用于高表达基因和低表达基因的可视化	➤ 使用带荧光成像功能的显微镜。推荐多光谱显微镜 / 成像系统（如 Nuance® EX、Mantra 和 Vectra）用于高自发荧光组织的成像。 ➤ 为了实现最佳的荧光检测，我们推荐使用高分辨率和高敏感度的冷却 CCD 成像系统，其像素大小为 64 μm 或以下，峰值量子效率 > 65% ➤ 常用成像系统型号包括：Orca-Flash 4.0（Hamamatsu）和 Nuance® EX（Perkin Elmer）

2

第 2 章 开始之前

在首次使用 RNAscope[®] 分析用于样本检测之前，我们建议您：

- 访问 www.acdbio.com/technical-support/learn-more，观看视频演示，或关注 ACD 微信号观看视频、或者优酷搜索 RNAscope 观看相关视频。。
- 核对 RNAscope[®] 多通道二代荧光检测所需的材料和设备清单

重要流程指南

- 选用适当固定并制备切片。详见第 11 页的第 3 章样本制备与预处理、第 35 页的附录 A 组织预处理推荐条件，以及我们的《样本制备与预处理用户指南》（可访问网站 <http://www.acdbio.com/technical-support/user-manuals>）。
- 推荐使用 SuperFrost Plus[®] 载玻片（Fisher Scientific, 货号 12-550-15）。
- 对样本使用阳性和阴性对照探针，以评价样本 RNA 的质量并对检测条件进行可能的优化。
- 不要随意替换所需的材料。只有这些材料通过了 ACD 的验证可以用于 RNAscope[®] 实验。
- 请严格遵循实验方案，以获得最佳检测结果。
- 除说明书中提及的可干燥步骤外，其他操作过程中切勿使切片干燥。
- 遵守实验室质量管理规范，并采取必要的安全措施。更多信息请参阅第 38 页的附录 C 安全性。

3

第 3 章 样本制备与预处理

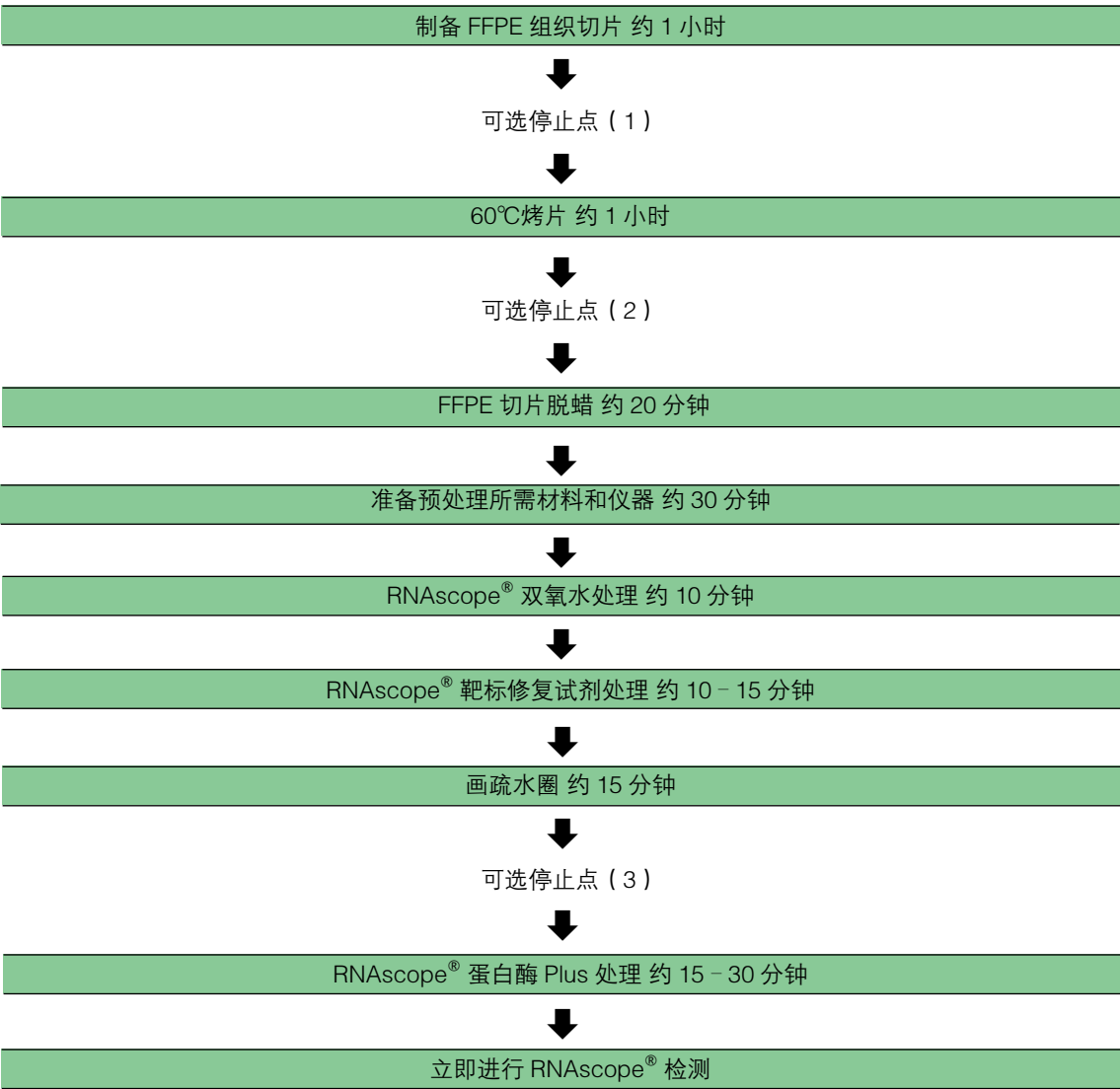
本章介绍了三种不同组织切片的制备与预处理方法：福尔马林固定石蜡包埋（FFPE）切片样本制备与预处理、固定后冰冻切片样本制备与预处理、新鲜冰冻切片样本制备与预处理。其它类型样本的制备与预处理方法，请联系 support@acdbio.com 获取最新操作流程和指南。

重要！ 我们强烈建议遵循这些指南。如果使用其他方法，我们不能保证检测结果。

福尔马林固定石蜡包埋切片样本制备与预处理

对于未达到最佳处理的样本，您可能需要优化预处理条件。参阅第 35 页的附录 A 组织预处理推荐条件，也可访问网站 <http://acdbio.com/technical-support/solutions> 获取支持。

工作流程



所需材料

由 RNAscope® 预处理试剂盒提供的材料	其它材料和设备
➤ RNAscope® 双氧水 ➤ RNAscope® 蛋白酶 Plus ➤ RNAscope® 靶标修复试剂	➤ 10% 中性缓冲福尔马林（NBF） ➤ PBS ➤ Tissue-Tek® 清洗剂皿 ➤ Tissue-Tek® 染色皿 ➤ Tissue-Tek® 24 位垂直载玻片架 ➤ 100% 乙醇（EtOH） ➤ 二甲苯 ➤ 切片机 ➤ 水浴箱 ➤ SuperFrost® Plus 载玻片 ➤ ImmEdge™ 疏水笔 ➤ 干燥烤箱 ➤ 蒸馏水 ➤ 通风橱 ➤ HybEZ™ 杂交系统 ➤ 纸巾或吸水纸 ➤ 热板 ➤ 温度计

制备 FFPE 组织切片

1. 样本取材后,立即放入 **10% NBF, 室温 (RT)** 下固定 **16-32** 小时。根据组织类型和大小,固定时间有所不同。



警告! 请妥善处理生物标本。

重要! 固定时间少于 16 小时 或 长于 32 小时, 将影响 RNAscope® 检测的结果。

2. 用 1× PBS 清洗样本。

3. 使用乙醇进行逐级脱水, 然后使用二甲苯对样本进行透明。

重要! 使用新鲜试剂。

4. 采用标准流程对样本进行石蜡包埋。

注: 包埋好的样本可在有干燥剂的条件下室温存储。为了能够长期 (>1 年) 更好地保证 RNA 质量, 推荐在有干燥剂下 2-8° C 存储。

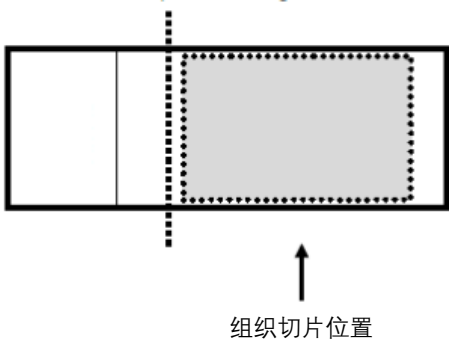
5. 根据需要修石蜡块, 用切片机将包埋好的组织切成 **5 +/- 1 µm** 的切片。

6. 捞片, 将切片贴附在 **SUPERFROST® Plus** 载玻片上。如图所示放置组织, 以获得最佳染色:

重要! 每张载玻片只贴附一个切片。将切片放置于载玻片的中心。

7. 在**室温**下过夜风干载玻片。

可选停止点 (1) 。请使用 3 个月内制备的组织切片。请在室温下使用干燥剂存储切片。



烤片

在干燥箱中于 **60° C** 烤片 **1 小时**。

可选停止点 (2) 。烤片完成后立即使用, 或在有**室温下**使用干燥剂存储, 存储时间不得超过 1 周。存储过久可能会导致样本 RNA 降解。

FFPE 切片脱蜡

试剂可提前准备。确保所有容器均加盖密封。

1. 在通风橱内:

● 在两个 Tissue-Tek® 清洗皿中加入约 200mL 新鲜的二甲苯。

● 在两个 Tissue-Tek® 染色皿中加入约 200mL 新鲜的 100% 乙醇。

2. 将载玻片放入 Tissue-Tek® 载玻片架, 并浸没在第一个盛有二甲苯的皿中。

3. 在二甲苯中**室温**孵育 **5 分钟**, 不时地上下移动载玻片架。

4. 从第一个盛有二甲苯的皿中取出载玻片架, 然后立即放入第二个盛有二甲苯的皿中。

5. 在二甲苯中**室温**孵育 **5 分钟**, 不时地上下移动载玻片架。

6. 从第二个盛有二甲苯的皿中取出载玻片架, 然后立即放入盛有 100% 乙醇的皿中。

7. 在 100% 乙醇中**室温**孵育 **2 分钟**, 不时地上下移动载玻片架。

8. 从第一个盛有 100% 乙醇的皿中取出载玻片架, 然后立即放入第二个盛有 100% 乙醇的皿中。

9. 在 100% 乙醇中**室温**孵育 **2 分钟**, 不时地上下移动载玻片架。

10. 从载玻片架上取下载玻片, 有切片面朝上置于吸水纸上。在**室温下**风干载玻片至完全干燥。

准备预处理所需材料和仪器

1. 打开 HybEZ™ 杂交炉, 将温度设置为 **40° C**。

2. 将一张吸水纸放入湿盒内中, 并用蒸馏水将其彻底浸湿。

3. 盖上盖, 将湿盒放入杂交炉, 关闭炉门。在 **40° C** 下预热 **30 分钟**。

4. 向烧杯中倒入 1 瓶 (70mL) 10X 靶标修复试剂, 然后加入 630mL 蒸馏水, 混合制备得到 700mL RNAscope® 1X 靶标修复试剂。用锡箔纸覆盖烧杯, 将烧杯放在热板上。将加热板调至高档, 加热 10-15 分钟。待 1X 靶标修复试剂锡箔纸达到**缓慢沸腾状态 (98-102°C)** 后, 将热板调至抵挡, 以维持缓慢沸腾状态。使用前煮沸不超过 **30 分钟**。

RNAscope® 双氧水处理

1. 将已脱蜡的载玻片放置在 HybEZ™ 载玻片架上，滴加约 5–8 滴 RNAscope® 双氧水，使其覆盖样本。
2. **室温**下孵育载玻片 **10 分钟**。
3. 在吸水纸上轻敲和 / 或轻弹载玻片，去除载玻片上的 RNAscope® 双氧水。立即将载玻片插入浸没于装满蒸馏水的 Tissue–Tek® 清洗皿中的 Tissue–Tek® 载玻片架上。
4. 上下移动 Tissue–Tek® 载玻片架，清洗载玻片 3–5 次。
5. 用新鲜蒸馏水重复步骤 4。

RNAscope® 靶标修复试剂处理

重要！ 在开始之前，参阅第 35 页的**附录 A 组织预处理推荐条件**，确保您已知晓您样本类型的特定预处理条件。

1. 用镊子将 Tissue–Tek® 载玻片架**非常缓慢**地浸没在 1X 靶标修复试剂中。按照第 35 页的**附录 A 组织预处理推荐条件**中的时间和温度对载玻片进行预处理。标准条件一般为 **15 分钟**。
2. 用镊子**立即**将热载玻片架从 1X 靶标修复试剂中转移至盛有蒸馏水的染色皿中。**请勿在 1X 靶标修复试剂中冷却载玻片。**

重要！ 1X 靶标修复试剂不重复回收使用。

3. 上下移动 Tissue–Tek® 载玻片架，清洗载玻片 3–5 次。
4. 将载玻片转移至 100% 乙醇，孵育 **3 分钟**。
5. **室温**下完全干燥载玻片。

画疏水圈

1. 使用 Immedge™ 疏水笔按照以下模板在每张切片周围画疏水圈 2–4 次。

重要！ 不要让疏水圈接触组织切片。强烈推荐使用 Immedge™ 疏水笔。其它疏水笔可能无法达到最理想的效果。



注：即使是较小的切片，疏水圈的尺寸也不宜过小，而且实验所需试剂体积不应低于推荐量。疏水圈较大时，每个试剂盒所能做的 RNAscope® 检测次数会相应减少。

2. 在**室温**下完全干燥疏水圈或**过夜干燥**。

注：如果在后续实验过程中需要重新画疏水圈，可用 kimwipe 纸擦干载玻片的相应区域。请勿接触组织切片。

可选停止点 (3)。可过夜干燥载玻片用于次日继续实验，或直接进入下一步。

RNAscope® 蛋白酶 Plus 处理

1. 将载玻片置于 EZ–Batch™ 载玻片夹上，滴加约 5 滴 RNAscope® 蛋白酶 Plus 试剂，以完全覆盖切片。
 2. 从 HybEZ™ 杂交炉中取出 HybEZ™ 湿盒，将载玻片夹放入盒中，盖上盖，放入杂交炉。
 3. 按照第 35 页**附录 A 组织预处理推荐条件**中时间和温度（**40° C**）进行预处理。标准条件一般为 30 分钟。
- 注：**如有需要，可在此步骤期间准备 RNAscope® 检测所需材料。
4. 从杂交炉取出 HybEZ™ 湿盒。从盒中取出 EZ–Batch™ 载玻片夹。
 5. 立即将 EZ–Batch™ 载玻片夹放入盛有蒸馏水的 EZ–Batch™ 清洗槽中。不时地晃动 EZ–Batch™ 清洗槽，清洗载玻片 3–5 次。
 6. 使用新鲜的蒸馏水重复步骤 5。

进行 RNAscope® 检测

在清洗载玻片后，立即进行第 25 页**第 4 章**所述的 **RNAscope® 多通道二代荧光检测**。

固定后冰冻组织切片样本制备与预处理

对于未达到最佳处理的样本，您可能需要优化预处理条件。参阅第 35 页的附录 A 组织预处理推荐条件，也可访问网站 <http://acdbio.com/technical-support/solutions> 获取支持。

工作流程



所需材料

由 RNAscope® 预处理试剂盒提供的材料	其它材料和设备
➤ RNAscope® 双氧水 ➤ RNAscope® 蛋白酶 III ➤ RNAscope® 10X 靶标修复试剂	➤ 低温包埋剂 (OCT) ➤ 干冰、液氮或异戊烷 ➤ 冰冻切片机 ➤ 载玻片盒 ➤ SuperFrost® Plus 载玻片 ➤ 锡箔纸 ➤ PBS ➤ 10% 中性缓冲福尔马林 (NBF) 或 4% 多聚甲醛 (PFA) ➤ 30% 蔗糖 ➤ Tissue-Tek® 24 位垂直载玻片架 ➤ Tissue-Tek® 染色皿 ➤ ImmEdge™ 疏水笔 ➤ HybEZ™ 杂交系统 ➤ 蒸馏水 ➤ 纸巾或吸水纸 ➤ 热板 ➤ 温度计

固定样本

1. 如果需要，使用 1 × PBS 新鲜配制的 4% 多聚甲醛 (PFA) 灌注组织，或直接转到步骤 2。
2. 组织取材后立即将其放入新鲜配制的 4%PFA 中，**4° C** 下固定 **24 小时**。

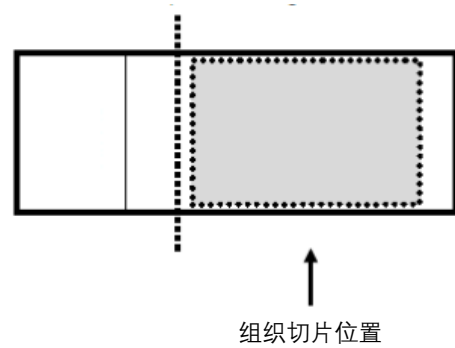
冰冻组织包埋

- 1.**4° C** 下将组织浸泡在含 10% 蔗糖的 1 × PBS 中，直至组织沉到容器的底部（脑组织约需 **18 小时**）。
2. 在含 20% 蔗糖的 1 × PBS 中重复上述步骤，之后再放入含 30% 蔗糖的 1 × PBS 中。每次都要等到组织沉到容器底部。
3. 用 OCT 包埋组织，并使用干冰或液氮进行冰冻，并将其保存在 **-80° C**。

制备冰冻组织切片

1. 组织切片前，在 **-20° C** 平衡组织块，时长为至少 **1 小时**。
2. 用冰冻切片机将包埋好的组织切成 **7-15µm** 的切片。将切片粘附在 **SUPERFROST® Plus 载玻片**上。为获得最佳染色，按如图所示放置组织：

重要！ 每张载玻片上放置的切片不得超过一张。将切片放置在载玻片的中心。



3. 在 **-20° C** 下放置 **20 分钟** 干燥切片。如果不立即使用该切片，则在 **-80°C** 保存。

可选停止点 (1)。请在三个月内使用该冰冻组织切片。

3. 载玻片置于 Tissue-Tek® 载玻片架，用 200mL 1× PBS 中清洗载玻片 **5 分钟**，上下移动载玻片架以清洗去除 OCT。

准备预处理所需材料和仪器

1. 打开 HybEZ™ 杂交炉，将温度设置为 **40° C**。
2. 将一张吸水纸放入湿盒内中，并用蒸馏水将其彻底浸湿。
3. 盖上盖，将湿盒放入杂交炉，关闭炉门。在 **40° C** 下预热 **30 分钟**。
4. 向烧杯中倒入 1 瓶 (70mL) 10× 靶标修复试剂，然后加入 630mL 蒸馏水，混合制备得到 700mL RNAscope® 1× 靶标修复试剂。用锡箔纸覆盖烧杯，将烧杯放在热板上。将加热板调至高档，加热 10–15 分钟至 1× 靶标修复试剂达到**缓慢沸腾状态 (98-102°C)** 后，将热板调至低档，以维持缓慢沸腾状态。使用前煮沸不超过 **30 分钟**。

RNAscope® 双氧水处理

1. 将载玻片放置在 HybEZ™ 载玻片架上，滴加约 5–8 滴 RNAscope® 双氧水，使其覆盖样本。
2. **室温**下孵育载玻片 **10 分钟**。
3. 在吸水纸上轻敲和 / 或轻弹载玻片，去除载玻片上的 RNAscope® 双氧水。立即将载玻片插入浸没于装满蒸馏水的 Tissue-Tek® 清洗皿中的 Tissue-Tek® 载玻片架上。
4. 上下移动 Tissue-Tek® 载玻片架，清洗载玻片 3–5 次。
5. 用新鲜蒸馏水重复步骤 4。

RNAscope® 靶标修复试剂处理

重要！ 在开始之前，参阅第 35 页的**附录 A 组织预处理推荐条件**，确保您已知晓您样本类型的特定预处理条件。

1. 用镊子将 Tissue-Tek® 载玻片架**非常缓慢**地浸没在 1× 靶标修复试剂中。参考第 35 页的**附录 A 组织预处理推荐条件**中的预处理强度对载玻片进行预处理。对于固定后冰冻的样本，RNAscope® 靶标修复标准条件为 **5 分钟**。
2. 用镊子**立即**将热载玻片架从 1× 靶标修复试剂中转移至盛有蒸馏水的染色皿中。**请勿在 1× 靶标修复试剂中冷却载玻片。**

重要！ 1X 靶标修复试剂不重复回收使用。

3. 上下移动 Tissue-Tek® 载玻片架，清洗载玻片 3–5 次。
4. 将载玻片转移至 100% 乙醇，孵育 **3 分钟**。
5. **室温**下完全干燥载玻片。

画疏水圈

1. 使用 Immedge™ 疏水笔按照以下模板在每张切片周围画疏水圈 2–4 次。

重要！ 不要让疏水圈接触组织切片。强烈推荐使用 Immedge™ 疏水笔。其它疏水笔可能无法达到最理想的效果。



注：即使是较小的切片，疏水圈的尺寸也不宜过小，而且实验所需试剂体积不应低于推荐量。疏水圈较大时，每个试剂盒所能做的 RNAscope® 检测次数会相应减少。。

2. 在室温下完全干燥疏水圈或过夜干燥。

注：如果在后续实验过程中需要重新画疏水圈，可用 kimwipe 纸擦干载玻片的相应区域。请勿接触组织切片。

可选停止点 (2)。可过夜干燥载玻片用于次日继续实验，或直接进入下一步。

RNAscope® 蛋白酶 III 处理

1. 将载玻片置于 EZ-Batch™载玻片夹上，滴加约 5 滴 RNAscope® 蛋白酶 III 试剂，以完全覆盖切片。
2. 从 HybEZ™杂交炉中取出 HybEZ™湿盒，将载玻片夹放入盒中。盖上盖，将放入杂交炉。
3. 按照第 35 页**附录 A 组织预处理推荐条件**中时间和温度（**40° C**）进行预处理。标准条件一般为 30 分钟。
注：如有需要，可在此步骤期间准备后续 RNAscope® 检测所需材料。
4. 从杂交炉取出 HybEZ™湿盒。从盒中取出 EZ-Batch™载玻片夹。
5. 立即将 EZ-Batch™载玻片夹放入盛有蒸馏水的 EZ-Batch™清洗槽中。不时地晃动 EZ-Batch™清洗槽，清洗载玻片 3–5 次。
6. 使用新鲜的蒸馏水重复步骤 5。

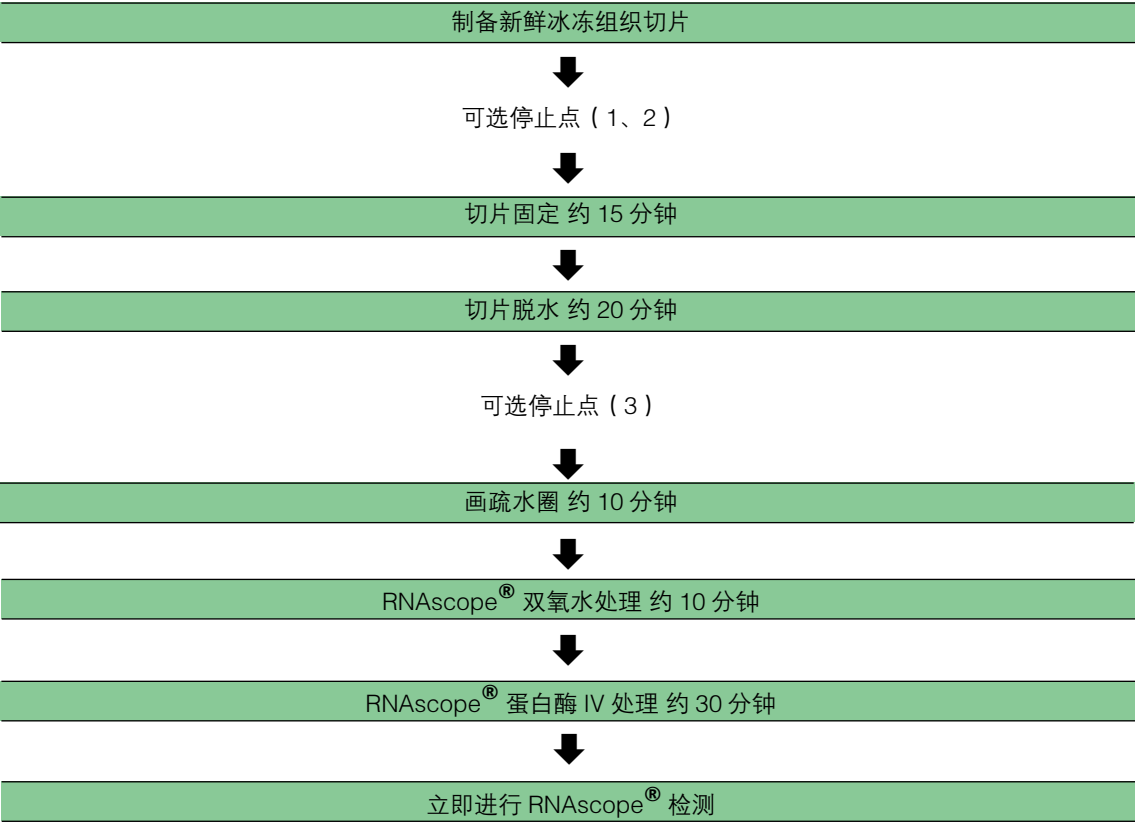
进行 RNAscope® 检测

在清洗载玻片后，立即进行第 25 页**第 4 章**所述的 **RNAscope® 多通道二代荧光检测**。

新鲜冰冻组织切片样本制备及预处理

重要！ 在使用 RNAscope® 多通道二代荧光试剂盒时，新鲜冰冻切片不需使用 RNAscope® 靶标修复试剂。其他类型样本可能需要 RNAscope® 靶标修复试剂。

工作流程



所需材料

由 RNAscope® 预处理试剂盒提供的材料	其它材料和设备
➤ RNAscope® 双氧水 ➤ RNAscope® 蛋白酶 III ➤ RNAscope® 蛋白酶 IV	➤ 低温包埋剂（OCT） ➤ 干冰、液氮或异戊烷 ➤ 冰冻切片机 ➤ 载玻片盒 ➤ SuperFrost® Plus 载玻片 ➤ 锡箔纸 ➤ PBS ➤ 10% 中性缓冲福尔马林（NBF）或 4% 多聚甲醛（PFA） ➤ 100% 乙醇（EtOH） ➤ Tissue–Tek®24 位垂直载玻片架 ➤ Tissue–Tek® 染色皿 ➤ ImmEdge™疏水笔 ➤ HybEZ™杂交系统 ➤ 蒸馏水 ➤ 纸巾或吸水纸

制备新鲜冰冻组织切片

1. 修整组织使其适应冰冻切片用包埋模具。



警告！ 请妥善处理生物标本。

2. 组织取材 **5 分钟**内将样本用干冰或液氮冷冻。

3. 使用低温包埋剂（OCT）包埋冰冻组织：

- a. 往包埋模具中滴加 2 滴 OCT；
- b. 将冷冻组织放在 OCT 上；
- c. 加入更多的 OCT 填满包埋模具。注意不要产生气泡。
- d. 用镊子夹住包埋模具，放在液氮表面或干冰 / 液氮冷却的异戊烷表面或者将包埋模具放在干冰上，使 OCT 完全凝固。

4. 将冰冻包埋组织块存储在 **-80° C**。

注：冰冻包埋组织块最多可以存放三个月。

可选停止点（1）。 在 3 个月内进行组织切片。

5. 组织切片：

- a 组织切片前，在 **-20° C** 平衡组织块，时长至少为 **1 小时**。
- b 用冰冻切片机将包埋好的组织切成 **10-20µm** 的切片。将切片粘附在 **SUPERFROST® Plus 载玻片上**。
- c 在 **-20° C** 下放置 **20 分钟**干燥切片。如果不立即使用该切片，则在 **-80°C**密封保存。

注：切片可最多存放三个月。

可选停止点（2）。 请在三个月内使用该冰冻组织切片。

切片固定

1. 将 200 mL 10% NBF(新鲜 10% NBF 或含 4% PFA 的 1 × PBS)加入到 Tissue Tek® 染色皿中，冷却至 **4° C**。
2. 从 **-80° C** 取出组织切片，放入 Tissue Tek® 载玻片架。
3. **立即**将组织切片浸入预冷的 10% NBF 固定液中。在 **4° C** 下固定 **15 分钟**。

注：储存超过六个月、或暴露于空气中一周以上或重复使用的福尔马林，可能会导致组织固定效果不佳。

切片脱水

试剂可以提前准备。确保所有容器均盖上盖子。

1. 在 Tissue Tek® 染色皿中准备 200 mL 50% 乙醇、 200 mL 70% 乙醇和 2 个 200 mL 100% 乙醇。
2. 将组织切片放入 50% 乙醇中，**室温**下孵育 **5 分钟**。
3. 将组织切片放入 70% 乙醇中，**室温**下孵育 **5 分钟**。
4. 将组织切片放入 100% 乙醇中，**室温**下孵育 **5 分钟**。
5. 用新鲜 100% 乙醇重复步骤 4。

可选停止点（3）。载玻片可在 100% 乙醇中于 **-20° C** 下储存 **1 周**。长期存储可能导致样本 RNA 降解。

画疏水圈

1. 将组织切片从 100% 乙醇中取出，切片朝上放在吸水纸上。**室温**下风干 **5 分钟**。
2. 使用 Immedge™疏水笔按照以下模板在每张切片周围画疏水圈 2–4 次。

重要！ 不要让疏水圈接触组织切片。强烈推荐使 用 Immedge™疏水笔。其它疏水笔可能无法达到最理想的效果。



注：即使是较小的切片，疏水圈的尺寸也不宜过小，而且实验所需试剂体积不应低于推荐量。疏水圈较大时，每个试剂盒所能完成的 RNAscope® 检测次数会相应减少。

3. 在**室温**下完全干燥疏水圈。

注：如果在后续实验过程中需要重新画疏水圈，可用 kimwipe 纸擦干载玻片的相应区域。请勿接触组织切片。

RNAscope® 双氧水处理

- 1. 将组织切片放置在 HybEZ™ 载玻片架上，滴加约 5–8 滴 RNAscope® 双氧水，使其覆盖样本。
- 2. 在**室温**下孵育载玻片 **10 分钟**。
- 3. 在吸水纸上轻敲和 / 或轻弹载玻片，去除载玻片上的 RNAscope® 双氧水。立即将载玻片插入浸没于装满 1× PBS 的 Tissue–Tek® 清洗皿中的 Tissue–Tek® 载玻片架上。
- 4. 上下移动 Tissue–Tek® 载玻片架，清洗载玻片 3–5 次。
- 5. 用新鲜 1× PBS 重复步骤 4。

RNAscope® 蛋白酶 IV 处理

- 1. 去除载玻片上多余的液体，将载玻片置于 EZ–Batch™载玻片架上，滴加约 5 滴 RNAscope® 蛋白酶 IV 试剂，以完全覆盖切片。
- 2. 将 EZ–Batch™载玻片夹放入 HybEZ™湿盒。盖上盖。**室温**孵育 **30 分钟**。
- 3. 从 HybEZ™湿盒中取出 EZ–Batch™载玻片夹。立即将 EZ–Batch™载玻片夹放入盛有 1× PBS 的 EZ–Batch™清洗槽中。
- 4. 不时地晃动 EZ–Batch™清洗槽，清洗载玻片 3–5 次。
- 5. 使用新鲜的 1× PBS 重复步骤 4。

重要! 实验完成后，如果观察到组织被过度消化，那么需要进行实验预处理条件优化。可以使用 RNAscope® 蛋白酶 III 代替 RNAscope® 蛋白酶 IV。

进行 RNAscope® 检测

在清洗载玻片后，**立即**进行第 25 页**第 4 章**所述的 **RNAscope® 多通道二代荧光检测**。

第 4 章 RNAscope® 多通道二代荧光检测

4

本章节流程为探针杂交与信号放大检测的流程。**请确保样本已经经过适当的 RNAscope® 预处理**。参考第 11 页**第 3 章 样本制备与预处理**，或特定类型样本对应的《样本制备与预处理用户手册》或联系技术支持：support@acdbio.com。

工作流程



检测所需的材料

RNAscope® 多通道二代荧光试剂盒提供的材料	RNAscope® 探针	其它材料和设备
➤ RNAscope® 50× 清洗缓冲液 ➤ RNAscope® 多通道二代荧光 AMP 1 ➤ RNAscope® 多通道二代荧光 AMP 2 ➤ RNAscope® 多通道二代荧光 AMP 3 ➤ RNAscope® 多通道二代荧光 HRP-C1 ➤ RNAscope® 多通道二代荧光 HRP-C2 ➤ RNAscope® 多通道二代荧光 HRP-C3 ➤ RNAscope® 多通道二代荧光 HRP 阻断剂 ➤ RNAscope® 多通道二代荧光 DAPI ➤ RNAscope® TSA 稀释液	➤ 靶标探针 ➤ 阳性对照探针 ➤ 阴性对照探针	➤ 经过 RNAscope® 预处理的切片 ➤ 蒸馏水 ➤ 玻璃瓶 (>3L) ➤ TSA® Plus 或 Opal™ 荧光染料 ➤ Tissue-Tek® 染色皿 ➤ HybEZ™ 杂交系统 ➤ 水浴箱或恒温箱 ➤ Tissue-Tek® 24 位垂直载玻片架 ➤ 移液管 (多尺寸) ➤ 纸巾或吸水纸 ➤ ProLong Gold 防淬灭封片剂 ➤ 盖玻片 ➤ 20X SSC (Sigma, 货号 S6639-1L)

准备材料

您可以在制备预处理试剂的同时准备其他试剂。请参阅样本制备与预处理用户手：<http://www.acdbio.com/technical-support/user-manuals>。

一些材料可以提前准备并在室温下储存。

制备 1× 清洗缓冲液

1. 将 RNAscope® 50× 清洗缓冲液在 **40° C** 下预热 **10-20 分钟**。
2. 将 5.88 L 蒸馏水和 2 瓶 (120 mL) RNAscope® 清洗缓冲液 (50×) 加入大玻璃瓶中，充分混合，配制成 6 L 的 1× 清洗缓冲液。
3. 1× 清洗缓冲液可以提前制备。可在室温下最多储存一个月。

准备探针

1. 在水浴箱或孵育箱中，**40° C** 预热探针至少 **10 分钟**，然后冷却至**室温 (RT)** 。
2. 快速离心将 C2 和 C3 探针液体收集在探针管底部。
3. 根据用量需求，取 1 体积 C2 、 1 体积 C3 探针和 50 体积 C1 探针混合备用。
- 注：**不要混合相同通道的探针。混合探针能够在 **2-8° C** 下最多存储六个月 (每次使用的时候都需预热) 。

平衡试剂

1. 从冰箱中取出 AMP 1、AMP2、AMP3、HRP-C1、HRP-C2、HRP-C3 和 HRP 阻断剂，置于**室温下**。
2. 确保 HybEZ™ 杂交炉和湿盒维持 **40° C**。
3. 150 mL 蒸馏水加 50 mL 20X SSC，充分混合，制备得到 200 mL 5X SSC。

进行 RNAscope® 二代荧光检测

重要！ 在后续步骤中**切勿**使切片变干。快速操作，并在疏水圈内加入相关试剂。

重要！ 在实验开始之前，请观看清洗步骤的视频：

<http://www.acdbio.com/technical-support/learn-more> 。

探针杂交

重要！ 在进行此步骤前，请确保您已经完成了样本制备与预处理，参考第 11 页**第 3 章 样本制备与预处理**，或特定类型样本对应的《样本制备与预处理用户手册》。

1. 去除 EZ-Batch™载玻片夹中的载玻片上多余的液体，滴加 4-6 滴探针混合物，完全覆盖样本。
- 注：请参阅第 37 页的**附录 B 试剂用量指南**，确定每张切片所需的试剂推荐滴数。例如，对于 20 mm × 20 mm 疏水圈，滴加 4 滴探针。
2. 将 EZ-Batch™载玻片夹放入 HybEZ™湿盒，盖上盖，放入 HybEZ™杂交炉。在 **40° C** 下孵育 **2 小时**。
3. 取出载玻片夹，立即将其放入盛有新鲜 RNAscope® 1× 清洗缓冲液的 EZ-Batch™清洗槽中。不时地晃动清洗槽，在室温下清洗载玻片 **2 分钟**。
4. 用新鲜 RNAscope® 1× 清洗缓冲液重复步骤 3。
- 可选停止点。载玻片可以在 5× SSC (试剂盒中不提供) 中在室温过夜存放。

杂交 AMP 1

1. 从 **5× SSC** 中取出载玻片，并使用新鲜 RNAscope® 1× 清洗缓冲液清洗载玻片 1–2 次。

注：如果未使用 5x SSC 的停止点，则直接滴加 Amp1。

2. 去除载玻片上多余的液体，滴加 4–6 滴 RNAscope® 多通道二代荧光 AMP1，完全覆盖样本。

3. 将载玻片夹放入湿盒，盖上盖，放入杂交炉。在 **40° C** 下孵育 **30 分钟**。

4. 取出载玻片夹，立即将其放入盛有新鲜 RNAscope® 1× 清洗缓冲液的 EZ–Batch™ 清洗槽中。不时地晃动清洗槽，在**室温**下清洗载玻片 **2 分钟**。

5. 用新鲜 RNAscope® 1× 清洗缓冲液重复步骤 4。

杂交 AMP 2

1. 去除载玻片上多余的液体，滴加 4–6 滴 RNAscope® 多通道二代荧光 AMP2，完全覆盖样本。

2. 将载玻片夹放入湿盒，盖上盖，放入杂交炉。在 **40° C** 下孵育 **30 分钟**。

3. 取出载玻片夹，立即将其放入盛有新鲜 RNAscope® 1× 清洗缓冲液的清洗槽中。不时地晃动清洗槽，在**室温**下清洗载玻片 **2 分钟**。

4. 用新鲜 RNAscope® 1× 清洗缓冲液重复步骤 3。

杂交 AMP3

1. 去除载玻片上多余的液体，滴加 4–6 滴 RNAscope® 多通道二代荧光 AMP3，完全覆盖样本。

2. 将载玻片夹放入湿盒，盖上盖，放入杂交炉。在 **40° C** 下孵育 **15 分钟**。

重要！ 在进行这一步骤期间，准备 TSA®Plus 荧光染料。参考后续步骤。

3. 取出载玻片夹，立即将其放入盛有新鲜 RNAscope® 1× 清洗缓冲液的清洗槽中。不时地晃动清洗槽，在**室温**下清洗载玻片 **2 分钟**。

4. 用新鲜 RNAscope® 1X 清洗缓冲液重复步骤 3。

重要！ 无论同时检测几个 RNA 靶标，杂交 AMP1、AMP2 和 AMP3 的步骤都需要全部完成。

准备 TSA®Plus 荧光染料

1. 根据 Perkin Elmer 公司的 TSA® Plus 荧光染料说明书，配置 TSA®Plus FITC、TSA®Plus Cy3 和 TSA® Plus Cy5 荧光染料储备液。

重要！ 将荧光染料在 **2-8° C** 下储存。请遵循 Perkin Elmer 公司的说明。

2. 确定本次实验所需 TSA® Plus 荧光染料的体积（每张载玻片 150–200 μ L）。

3. 用 RNAscope® 多通道二代荧光试剂盒提供的 TSA 缓冲液稀释 TSA® Plus 荧光染料。

TSA® Plus 荧光基团	PerkinElmer 货号	建议稀释范围 *
TSA® Plus FITC	NEL741E001KT* 或 NEL741001KT†	1:750–1:3000
TSA® Plus Cy3	NEL744E001KT* 或 NEL744001KT†	1:750–1:3000
TSA® Plus Cy5	NEL745E001KT* 或 NEL745001KT†	1:750–1:3000

* 推荐从 1：1500 的稀释比开始，根据实验结果的信号强度调整稀释比。

重要！ 稀释的 TSA® Plus 荧光染料可在 **2-8° C** 下避光存放一个月。

您也可以使用 Perkin Elmer 公司的 Opal™ 荧光染料替代 TSA® Plus 荧光染料。

TSA® Plus 荧光染料	Opal™ 荧光染料	PerkinElmer 试剂盒
TSA® Plus FITC	Opal 520	FP1487001KT: Opal 520 Reagent Pack
TSA® Plus Cy3	Opal 570	FP1488001KT: Opal 570 Reagent Pack
TSA® Plus Cy5	Opal 670 或 Opal 690	FP1496001KT: Opal 650 Reagent Pack
		FP1497001KT: Opal 690 Reagent Pack

C1 通道探针的信号标记

1. 去除载玻片上多余的液体，滴加 4–6 滴 RNAscope® 多通道二代荧光 HRP–C1，完全覆盖样本。

2. 将载玻片夹放入湿盒，盖上盖，放入杂交炉。在 **40° C** 下孵育 **15 分钟**。

3. 取出载玻片夹，立即将其放入盛有新鲜 RNAscope® 1× 清洗缓冲液的清洗槽中。不时地晃动清洗槽，在**室温**下清洗载玻片 **2 分钟**。用新鲜 RNAscope® 1× 清洗缓冲液重复 1 次。

4. 去除载玻片上多余的液体，滴加 150–200 μ L 稀释的 TSA® Plus FITC，完全覆盖样本。将载玻片夹放入湿盒，盖上盖，放入杂交炉。在 **40° C** 下孵育 **30 分钟**。

注：您可以根据需求，对探针通道和荧光染料进行适当匹配。例如，您可以将 TSA® Plus Cy3 或 Cy5 替代 TSA® Plus FITC 分配至 C1 通道。如果 TSA® Plus Cy5 被分配到 C1 通道，您可能需要提高 TSA® Plus Cy5 的浓度。不要将某一个荧光染料分配至多个探针通道。

5. 用新鲜 RNAscope® 1× 清洗缓冲液洗涤载玻片，在**室温**下洗涤 **2 分钟**。用新鲜 RNAscope® 1× 清洗缓冲液重复此步骤。

6. 去除载玻片上多余的液体，滴加 4–6 滴 RNAscope® 多通道二代荧光 HRP 阻断剂，完全覆盖样本。

7. 将载玻片夹放入湿盒，盖上盖，放入杂交炉。在 **40° C** 下孵育 **15 分钟**。

8. 取出载玻片夹，立即将其放入盛有新鲜 RNAscope® 1× 清洗缓冲液的清洗槽中。不时地晃动清洗槽，在**室温**下清洗载玻片 **2 分钟**。用新鲜 RNAscope® 1× 清洗缓冲液重复 1 次。

C2 通道探针的信号标记

1. 去除载玻片上多余的液体，滴加 4–6 滴 RNAscope® 多通道二代荧光 HRP–C2，完全覆盖样本。
 2. 将载玻片夹放入湿盒，盖上盖，放入杂交炉。在 **40° C** 下孵育 **15 分钟**。
 3. 取出载玻片夹，立即将其放入盛有新鲜 RNAscope® 1× 清洗缓冲液的清洗槽中。不时地晃动清洗槽，在**室温**下清洗载玻片 **2 分钟**。用新鲜 RNAscope® 1× 清洗缓冲液重复 1 次。
 4. 去除载玻片上多余的液体，滴加 150–200 μL 稀释的 TSA® Plus Cy3, 完全覆盖样本。将载玻片夹放入湿盒，盖上盖，放入杂交炉。在 **40° C** 下孵育 **30 分钟**。
- 注：**您可以根据需求，对探针通道和荧光染料进行适当匹配。例如，您可以将 TSA® Plus FITC 或 Cy5 替代 TSA® Plus Cy3 分配至 C2 通道。如果 TSA® Plus Cy5 被分配到 C2 通道，您可能需要提高 TSA® Plus Cy5 的浓度。不要将某一个荧光染料分配至多个探针通道。
5. 用新鲜 RNAscope® 1× 清洗缓冲液洗涤载玻片，在**室温**下洗涤 **2 分钟**。用新鲜 RNAscope® 1× 清洗缓冲液重复此步骤。
 6. 去除载玻片上多余的液体，滴加 4–6 滴 RNAscope® 多通道二代荧光 HRP 阻断剂，完全覆盖样本。
 7. 将载玻片夹放入湿盒，盖上盖，放入杂交炉。在 **40° C** 下孵育 **15 分钟**。
 8. 取出载玻片夹，立即将其放入盛有新鲜 RNAscope® 1× 清洗缓冲液的清洗槽中。不时地晃动清洗槽，在**室温**下清洗载玻片 **2 分钟**。用新鲜 RNAscope® 1× 清洗缓冲液重复 1 次。

C3 通道探针的信号标记

1. 去除载玻片上多余的液体，滴加 4–6 滴 RNAscope® 多通道二代荧光 HRP–C3，完全覆盖样本。
 2. 将载玻片夹放入湿盒，盖上盖，放入杂交炉。在 **40° C** 下孵育 **15 分钟**。
 3. 取出载玻片夹，立即将其放入盛有 RNAscope® 1× 清洗缓冲液的清洗槽中。不时地晃动清洗槽，在**室温**下清洗载玻片 **2 分钟**。用新鲜 RNAscope® 1× 清洗缓冲液重复 1 次。
 4. 去除载玻片上多余的液体，滴加 150–200 μL 稀释的 TSA® Plus Cy5, 完全覆盖样本。将载玻片夹放入湿盒，盖上盖，放入杂交炉。在 **40° C** 下孵育 **30 分钟**。
- 注：**您可以根据需求，对探针通道和荧光染料进行适当匹配。例如，您可以将 TSA® Plus FITC 或 Cy3 替代 TSA® Plus Cy5 分配至 C3 通道。不要将某一个荧光染料分配至多个探针通道。
5. 用新鲜 RNAscope® 1× 清洗缓冲液洗涤载玻片，在**室温**下洗涤 **2 分钟**。用新鲜 RNAscope® 1× 清洗缓冲液重复此步骤。
 6. 去除载玻片上多余的液体，滴加 4–6 滴 RNAscope® 多通道二代荧光 HRP 阻断剂，完全覆盖样本。
 7. 将载玻片夹放入湿盒，盖上盖，放入杂交炉。在 **40° C** 下孵育 **15 分钟**。
 8. 取出载玻片夹，立即将其放入盛有新鲜 RNAscope® 1× 清洗缓冲液的清洗槽中。不时地晃动清洗槽，在**室温**下清洗载玻片 **2 分钟**。用新鲜 RNAscope® 1× 清洗缓冲液重复 1 次。

复染和封片

重要！ 进行此步骤时，每次操作不要超过 5 张载玻片。

1. 去除载玻片上多余的液体，往每张载玻片滴加约 4 滴 DAPI，完全覆盖样本。
2. **室温孵育 30 秒**。
3. 去除 DAPI，并立即滴加 1–2 滴 Prolong Gold 防淬灭封片剂于载玻片上（试剂盒中不提供）。
4. 小心地将盖玻片放到组织切片上，避免气泡。
5. 在 **2-8° C** 下，避光保存载玻片。

5

第 5 章 检测结果分析

对照示例

荧光成像的建议

显微镜	物镜	图像捕捉
➤ Leica DM 系列或等效产品 ➤ Zeiss Axio 成像系统或等效产品 ➤ 如果光学元件和聚光器符合要求，倒置显微镜也可以接受 ➤ 需要激发 / 发射滤光片设置：DAPI/ FITC/Cy3/Cy5	➤ 20X (N.A 0.75) 干式物镜 ➤ 40X(N.A.0.8)干式物镜(推荐) ➤ 40X (N.A.1.3) 油浸物镜 ➤ 63X (N.A.1.3) 油浸物镜 – 可用于低表达的 RNA 靶标 ➤ 20X 和 40X 物镜可分别用于高表达基因和低表达基因的可视化	➤ 使用带荧光成像功能的显微镜。推荐多光谱显微镜 / 成像系统 (如 Nuance[®] EX、Mantra 和 Vectra) 用于高自发荧光组织的成像。 ➤ 为了实现最佳的荧光检测，我们推荐使用高分辨率和高敏感度的冷却 CCD 成像系统，其像素大小为 64 μ m 或以下，峰值量子效率 > 65% ➤ 常用成像系统型号包括：Orca-Flash 4.0 (Hamamatsu) 和 Nuance[®] EX (Perkin Elmer)

检测结果分析

在荧光显微镜下观察组织切片：

- 评估组织和细胞形态。
- 首先评估阴性对照探针染色背景。在 20× 物镜下观察时，每 10 个细胞有不超过一个信号点，表示染色背景可以接受。调节光源强度和曝光时间，以达到可接受的背景水平。
- 评估阳性对照探针检测信号。在 20× 物镜下观察时，阳性对照探针检测结果应为细胞内可见的点状信号。

如果 RNAscope[®] 多通道二代荧光检测成功，染色结果应该类似下图。

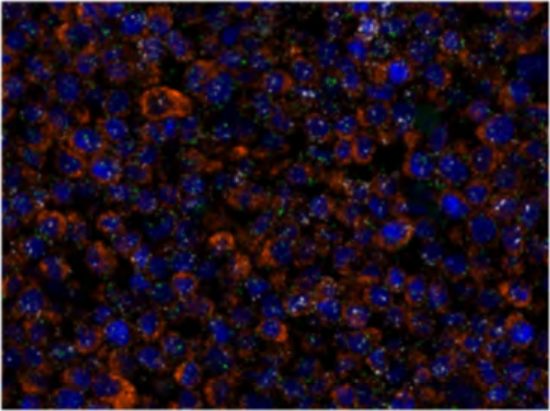


图 2 人 HeLa 细胞团 FFPE 切片使用 RNAscope[®] 多通道二代荧光试剂盒检测 TBP (绿色)、PPIB (橙色) 和 POLR2A (白色) mRNA。使用 Nuance[®] Fx 多光谱成像系统放大 400 倍成像。

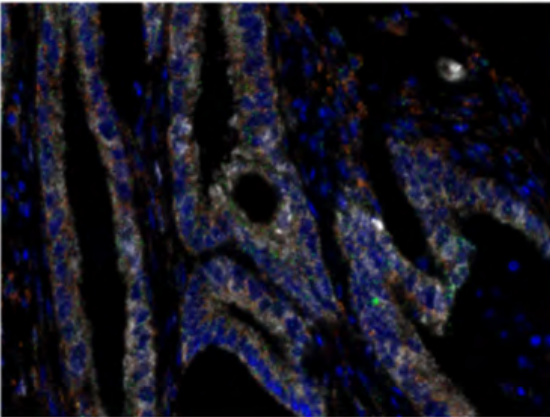


图 3 人结肠癌 FFPE 切片使用 RNAscope[®] 多通道二代荧光试剂盒检测 POLR2A (绿色)、PPIB (橙色) 和 UBC (白色) mRNA。使用 Nuance[®] Fx 多光谱成像系统放大 200 倍成像。

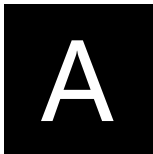
疑难解答

如果您得不到满意的结果，按照以下简单指南来进行疑难解答：

- 尽可能使用 ACD 推荐的荧光显微镜配置。
- 如果信号强度太低，增加 TSA Plus 荧光染料的浓度。使用阳性和阴性对照探针，评估信噪比。
- 使用合适配置的荧光滤光片，减少荧光渗漏。如果观察到荧光渗漏，减少渗漏通道 TSA Plus 荧光染料的浓度，和 / 或减少图像采集过程中的曝光时间，避免过度曝光。
- 如果组织自发荧光过高，不能区分 RNA ISH 信号和自发荧光，可增加 TSA Plus 荧光染料的浓度。
- 如果观察到背景染色，减少相应的 TSA Plus 荧光染料浓度。降低成像灵敏度，在背景低于检测限的设置条件下获取图像。
- 只使用本文档中列出的试剂。不要用任何其它 RNAscope[®] 试剂盒的组分替代这些试剂。

有关疑难解答的详细信息，请联系技术支持：support@acdbio.com。

附录 A 组织预处理推荐条件



针对下述类型的组织，请采用我们推荐的预处理条件：

- 任何新的或以前未检测的 FFPE 组织类型
- 与第 3 章中所述的样本制备方案不同而制备的样本。

组织预处理推荐条件

- 1.ACD 推荐针对每一例样本均使用阳性和阴性对照探针进行 RNAscope[®] 检测，以检测样本 RNA 保存质量和最佳的组织预处理条件。
 2. 对于 FFPE 样本的制备，推荐样本取材后在新鲜的 10% NBF 中在**室温**下固定 **16-32 小时**。
- 注：**请采用推荐的组织固定时间。如果固定过度或固定不足，RNAscope[®] 检测会出现明显的信号损失。
3. 对于 FFPE 样本，请根据您的组织类型，设定靶标修复试剂和 / 或蛋白酶 Plus 处理的时间（参见以下章节）。

试剂	温和	标准	延长
RNAscope [®] 靶标修复试剂	15 分钟	15 分钟	30 分钟
RNAscope [®] 蛋白酶 Plus	15 分钟	30 分钟	30 分钟

有些样本类型，如异体移植物和细胞团等样本，需要的预处理时间较短。对于这些组织类型，RNAscope[®] 靶标修复试剂的处理时间可为 **8 分钟**，RNAscope[®] 蛋白酶 Plus 的处理时间为 **15 分钟**。如果您的组织类型没有包括在下表中，请联系技术支持：**support@acdbio.com**。

组织特异性预处理条件

如果您的样本用新鲜 10% NBF 固定（上述第 2 步），请参照下表所列出的组织特异性预处理条件。对于下表未列出的物种或组织类型信息，请联系技术支持：support@acdbio.com。

物种	组织类型	病状	预处理条件
小鼠 / 大鼠	肠	正常	标准
	肠	肿瘤	标准
	胚胎	正常	标准
	大脑	正常	标准
	脾	正常	温和
	眼 / 视网膜	正常	标准
	肝	正常	延长
	肾脏	正常	标准
人类	乳腺	肿瘤	标准
	结肠	肿瘤	标准
	结肠	正常	标准
	肺	肿瘤	标准
	肺	正常	标准
	前列腺	肿瘤	标准
	前列腺	正常	标准
	淋巴结	肿瘤	标准
	淋巴结	正常	标准
	扁桃体	正常	标准
	胰腺	正常	标准
	子宫颈	癌症	标准
	子宫颈	正常	标准
	子宫颈非典型增生	异常	标准
	脑	肿瘤	标准
	脑	正常	标准
	头	癌症	标准
	颈	癌症	标准
	肝	癌症	标准
	肾脏	正常	标准
	皮肤	正常	标准
	黑色素瘤	肿瘤	标准
	痣	温和	标准
	胎盘	正常	标准
	皮肤（TMA*）	正常	标准
	乳腺（TMA）	正常	标准
	黑色素瘤（TMA）	正常	标准
	痣（TMA）	良性	标准
	胃（TMA）	正常	标准
	胃（TMA）	肿瘤	标准
	细胞团，用 10% NBF 固定	—	温和
	HeLa 细胞，用 10% 福尔马林 /PBS/ACD 对照固定	—	温和

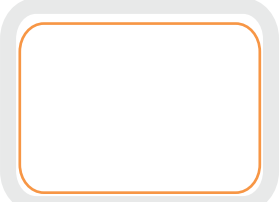
* 组织芯片

附录 B 试剂用量指南

B

确定试剂用量

开始实验之前，测量疏水圈的内缘尺寸，以确定每张载玻片需要的推荐滴数（见下表）。

疏水圈尺寸* (英寸)	每张载玻片 推荐滴数	每张载玻片 推荐用量 (μ L)	相对模板尺寸
0.75” × 0.75” †	4	120	
0.75” × 1.0”	5	150	
0.75” × 1.25”	6	180	

* 在疏水内缘测量其尺寸。本用户使用说明书中的参考值适用于 0.75" × 0.75" 的疏水圈。

† 推荐的疏水圈尺寸是 0.75" × 0.75"。对于这个尺寸的疏水圈，每个探针足以用于 20 张切片的检测。使用较大的组织切片时，每套试剂盒所能完成的 RNAscope® 检测次数会相应减少。



附录 C 安全性

化学品安全性



警告！ 为了尽量减少一般化学危害，请确保实验室人员阅读并遵循以下有关化学品使用、储存和废弃处理的通用安全指南，并参考相关 SDS 获取具体预防措施和指导：

- 在储存、处理或使用任何化学品或危害材料之前，请阅读并遵守化学品制造商提供的安全说明书（SDS）。如需获取 SDS，请访问网站 <http://www.acdbio.com/technical-support/user-manuals>。
- 尽量减少与化学品的接触。在处理化学品时，应穿戴适当的个人防护装备（例如护目镜、手套或防护服）。
- 尽量避免吸入化学品。切勿使化学容器保持敞开状态。仅在通风设备（例如通风橱）的条件下使用化学品。
- 对实验室中特殊应用、试剂和底物等产生的废物进行分类（必要时进行分析）。
- 确保根据当地、州 / 省和 / 或国家法规，进行废物储存、转移、运输和处理。
- 重要！** 放射性或生物危害性材料可能需要经过特殊处理，其处理可能会有限制。

生物危害安全性



警告！ 生物危害。组织、体液、感染病原物以及人类与其它动物的血等生物样本可能会传播传染性疾病。应遵循所有现行的当地、州 / 省和 / 或国家法规。请穿戴适当的防护装备，包括但不限于：护目镜、面罩、防护服 / 实验服以及手套。所有工作应在设备齐全的设施内使用合适的设备（例如物理隔离设备）的条件下完成。在接触具有潜在传染性危害的材料之前，操作人员应根据现有的法律法规和公司 / 机构要求接受培训。请阅读并遵守下列适用指南和 / 或法规要求：

在美国：

- 美国卫生及公共服务部公布的微生物和生物医学实验室生物安全性指南，详见网站 www.cdc.gov/biosafety
- 血源性病原体职业安全与健康标准（29 CFR § 1910.1030），详见网站 www.access.gpo.gov/nara/cfr/waisidx_01/%2029cfr1910a_01.html
- 贵公司 / 机构关于使用 / 处理潜在传染性材料的生物安全程序方案。
- 关于生物危害指南的更多信息，请访问网站 www.cdc.gov/

在欧盟：

- 查阅当地的生物危害和生物安全防范指南和法规，参考世界卫生组织（WHO）《实验室生物安全手册》（第三版）上的最佳实践，详见网站 http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO_2004_11/en/
- 关于化学品等级、评估、授权和限制的信息，可以访问网站 <http://echa.europa.eu/regulations/reach>

文件与支持

获取 SDS

可访问网站：<http://www.acdbio.com/technical-support/user-manuals> 获取安全说明书（SDS）。如果化学品并非由 Advanced Cell Diagnostics 提供，请联系化学品生产商。

获得支持

访问网站 <http://www.acdbio.com/technical-support/support-overview> 获取最新的服务和技术支持信息

在此网站上，您可以：

- 获取技术支持和销售部门的电话和传真号码。
- 搜索常见问题与解答（FAQ）。
- 直接向技术支持部门提交问题。
- 搜索用户手册和说明书、SDS、文献、培训视频和其他产品支持文件。
- 了解客户培训活动的信息。

联系信息

Advanced Cell Diagnostics 有限公司

地址：7707 Gateway Blvd Suite 200

Newark, CA 94545

免费电话：1-877-576-3636

直拨电话：1-510-576-8800

传真：1-510-576-8801

咨询：info@acdbio.com

订购：orders@acdbio.com

技术支持邮箱：support@acdbio.com

有限产品质保

Advanced Cell Diagnostics 公司和 / 或其附属机构对其产品提供《ACD 销售通用条款与条件》中规定的产品质保，详见 ACD 网站 <http://www.acdbio.com/store/terms>。如有任何问题，请通过 <http://www.acdbio.com/about/contact> 联系 Advanced Cell Diagnostics 公司。



爱兴德生物科技（北京）有限公司

电话：010-67881190

免费服务电话：400-966-1796

ACD 中国官方微信号：ACD_China

北京市经济技术开发区

西环南路 26 号院 15 号楼

www.acdbio.com

