

# RNAscope<sup>®</sup> 试剂指南

## RNA 原位杂交 (ISH) 检测基因表达

单次检测中获取带形态学特征信息的定量分子检测



RNAscope® 分析是一项以 ACD 专利技术为基础的新型 RNA 原位杂交 (ISH) 检测方法，可以在放大信号的同时抑制背景噪音，从而推进了 RNA 在组织和细胞中的检测。该技术与众不同之处在于，RNAscope® 可以在同一检测过程中，逐个细胞对不同类的 RNA 进行定量分析，在兼具高灵敏度和高特异性的同时提供形态学特征信息。这使得研究人员能够直接观察哪些基因被表达出来了，还可定位基因表达位置，并定量基因表达水平。

## 研究领域

在过去的 5 年中，RNAscope® 技术已用于多个研究领域中，发表文章超过 2000 篇，具有极强的通用性。独有的特征和非凡的性能表现使 RNAscope® 技术成为可用于任何研究和临床前研究实验室的重要工具。

- 肿瘤研究
- 干细胞
- 神经科学
- 细胞生物学
- 免疫治疗
- 移植模型
- 感染性疾病
- 临床前安全评估
- 其他.....



\* until January 2019

## 探索 RNAscope® 世界

RNAscope® 技术原理和特征 .....	4
解决共同研究的挑战 .....	6
RNAscope® 原位杂交手动检测流程 .....	8

### 步骤 01. 透化

将组织切片或细胞固定在载玻片上，并用 RNAscope® 预处理试剂进行预处理，以暴露出靶 RNA，并使细胞透化。

预处理试剂 / 第 8 页

### 步骤 02. 杂交

双 Z 探针与靶 RNA 分子进行杂交

RNAscope® 靶向探针 / 第 9 页；

RNAscope® 对照探针 / 第 9 页

### 步骤 03. 扩增

依次杂交信号放大分子和标记探针

RNAscope® 检测试剂 / 第 10 页；

附件 / 第 13 页

### 步骤 04. 成像

每个点状信号代表一个靶 RNA 单分子，可以通过显微镜观察

第 14 页

### 步骤 05. 定量

单分子信号定量是逐个细胞进行的，既可以通过手工计数，也可以采用 RNAscope® SpotStudio™ 或 HALO 软件进行自动成像分析

RNAscope® SpotStudio™ 软件和 HALO 软件 / 第 14 页

# RNAscope® 技术原理和特征

创造性地在单细胞水平对单拷贝 RNA 分子进行检测和定量

## RNAscope® 探针设计

一个标准探针是由 20 对 Z 探针组成，靶向长度为 1000 个碱基 的区域。每个 Z 靶向探针由三部分组成：底端区域与靶 RNA 互补，是与靶标特异性杂交的区域，杂交性能统一；间隔序列连接底端与顶端区域；来自同一对双 Z 靶探针的两个相邻的顶端区域形成长为 28 个碱基的 结合位点，可与信号预放大分子结合。

两个独立的 Z 探针构成探针对，要能与靶标序列串联杂交，从而保证可以与信号预放大分子结合。

杂交过程中可能会发生单个 Z 探针的非特异性杂交，但单个 Z 探针与信号预放大分子的杂交很不稳定，因而可以在清洗步骤中除去，这一设计可以极大地降低背景噪音。

## RNAscope® 探针杂交和扩增：

**步骤 1:** 平均 20 个 Z 探针对与靶 RNA 结合

**步骤 2:** 信号预放大分子与 Z 探针对顶端区域结合

**步骤 3:** 多个信号放大分子与每个信号预放大分子的杂交

**步骤 4:** 多个标记探针与每个信号放大分子的杂交 20 个 Z 探针对，多重信号放大分子，多个标记探针——这一级联杂交使一个靶 RNA 可以与上千个标记探针杂交

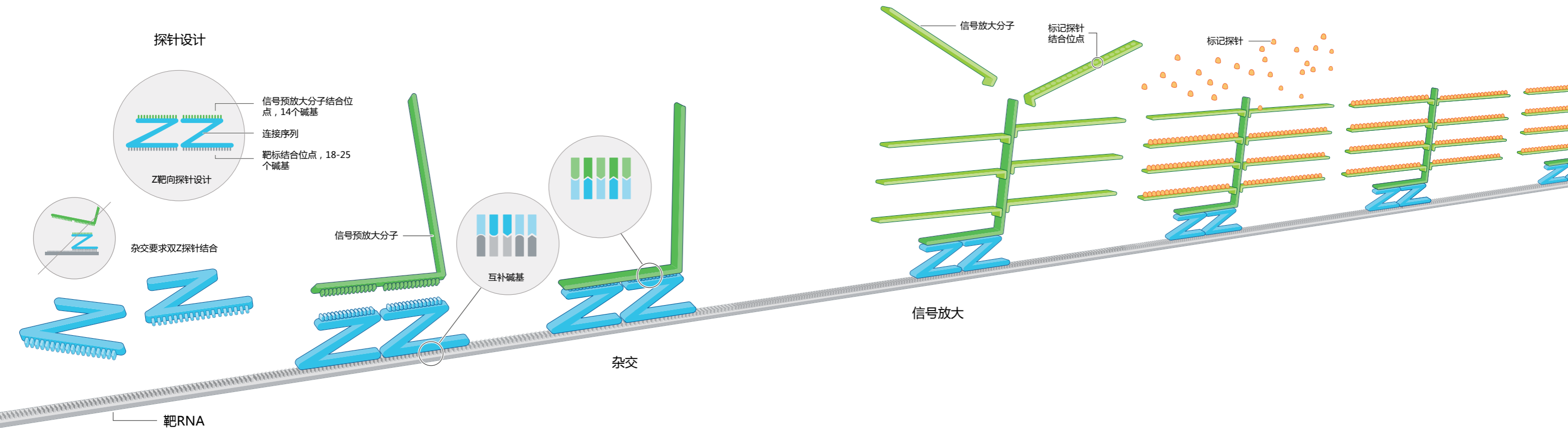
## RNAscope® 信号检测

标记探针含有发色酶或荧光基团，每个靶 RNA 形成一个点状信号。点的大小与杂交到靶 RNA 上的 Z 探针对数目成正比（见第 14 页 - 成像步骤）。

三个 Z 探针对杂交产生的信号即可被明场显微镜或荧光显微镜 检测到。

## RNAscope® 技术优势

- **灵敏度高:** 级联信号放大设计提升了检测灵敏度，从而可以检测到单拷贝 RNA 分子。
- **特异性强:** 专利探针设计确保了靶向特异性结合，而双 Z 探针设计可以抑制非特异性杂交信号扩增。
- **保留形态学特征:** 可以在复杂的组织环境中进行基因表达的空间解析。
- **单细胞水平定量:** 高灵敏度和形态学特征的结合实现了单细胞分辨率上的单分子检测。
- **通用性:** 几乎适用于所有组织类型中的所有基因。



# 解决共同研究的挑战

## 新生物标志物的快速验证

NGS、芯片和高通量 qPCR 是新标志物标识的常用方法，但 RNAscope® 技术是一个适用于生物标志物所有验证阶段的快速简便的分析工具。通过 RNAscope® 技术，您有机会获得独特的 RNA 空间表达信息：即对复杂组织结构中单细胞的 RNA 表达水平进行数字定量。

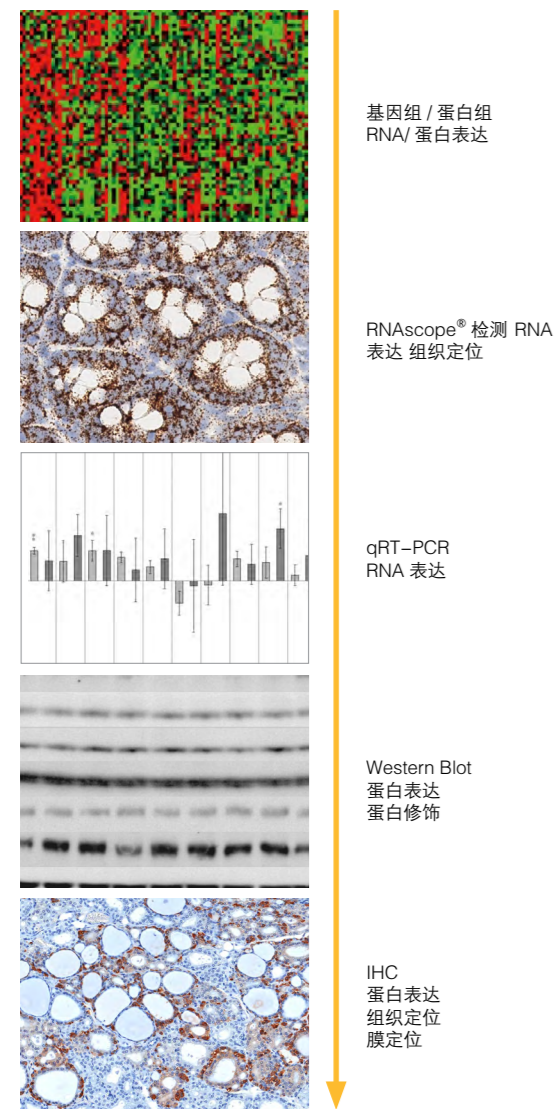


图 1. RNAscope® 检测是靶标验证的第一道简单过滤器窗口

## RNA 表达分析补充或替代基于 IHC 的蛋白分析

IHC 作为一种蛋白标志物的检测方法，广泛应用于临床疾病的诊断、预后和治疗。然而，高质量的可靠抗体数目有限（见图 2），IHC 也存在一定问题。此外，抗体标识有时质量差，整体标准化的不足常常导致结果不可信。而 RNAscope® 技术是基于高度靶向特异性的探针设计，可重复生产。这一独特可重复的方案使 RNAscope® 检测成为验证，补充或替代 IHC 的理想方法。

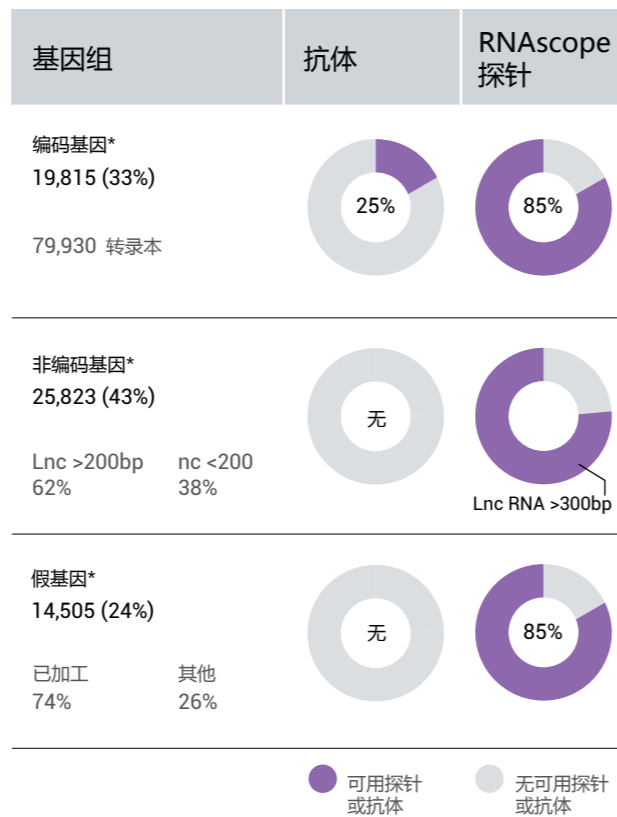


图 2. 用于不同类别基因的可用抗体和 RNAscope® 探针

\* 数据来源: Genecode v24, August 2015

## 缺乏蛋白质的 RNA 表达

在过去的十年里，长链非编码 RNA (LncRNA) 引起了极大的关注，有望成为适用于多个研究领域的生物标志物。由于没有蛋白质和相应抗体使得 RNA ISH 成为唯一可在完整形态学环境中分析 LncRNA 表达的方法（图 3）。

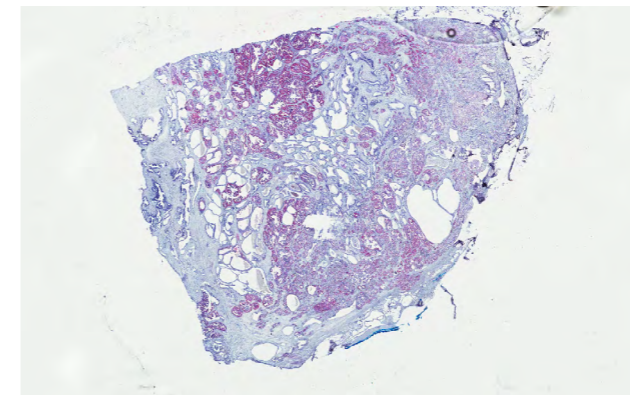


图 3 RNAscope® 技术检测前列腺癌非编码 PCA3 转录本水平

“这项技术使我们可以直接看到靶组织的基因表达情况 - 例如，在同一样本中，我们可以分辨出基因过表达究竟发生在良性前列腺腺体，高级别前列腺上皮内瘤变 (HGPIN - 一种癌前期状态) 还是前列腺癌。”

密歇根转译病理学中心 (Michigan Center for Translational Pathology) 病理学临床助理教授 Mehra 博士

## 独特的 RNA ISH 技术，可用于所有研究



更多信息获取, 请访问 [acdbio.com/applications](http://acdbio.com/applications)

# RNAscope® 原位杂交手动检测

## 技术流程和相关产品

### 步骤 01. 透化

### RNAscope® 预处理试剂 优化透化条件，方便与靶标杂交

RNAscope® 检测前，进行适当的样品制备和预处理。样品制备和预处理过程如下：

- 按需进行细胞固定（如新鲜冷冻组织，培养的细胞，PBMCs 等）
- 按需进行脱蜡（FFPE 处理）
- 用 RNAscope® 试剂盒中的预处理试剂进行样品预处理

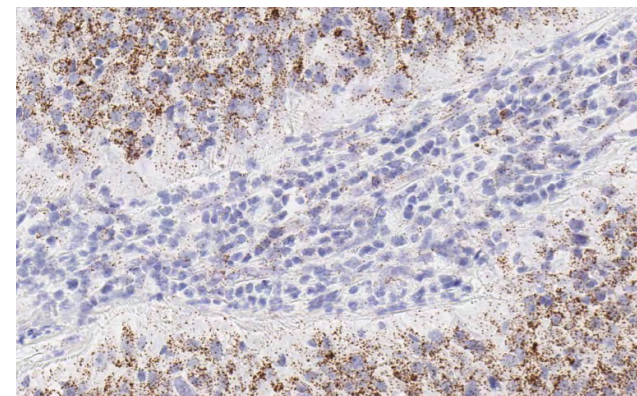


图 6. RNAscope® HD 2.5 kit-BROWN 用于人宫颈样本中 Ppib 的检测（棕色点）。

RNAscope® 2.5 预处理试剂可以提供暴露靶标 RNA 的优化条件，降低了检测优化时间和精力。该预处理试剂盒中含有过氧化氢，可以封闭内源过氧化物酶活性；组织固定过程中可能会产生 RNA 交联，靶标修复剂和蛋白酶预处理试剂可以打断这种交联以便探针与靶 RNA 杂交。RNAscope® 2.5 预处理试剂适用于多种组织类型，包括福尔马林固定石蜡包埋（FFPE）组织（包括存档组织）、新鲜冰冻（FF）组织、固定后冰冻组织、组织芯片（TMA）和细胞样品。

若需要在不同样本类型间切换（如新鲜冰冻组织，FFPE 或细胞样品），我们推荐使用 RNAscope® 2.5 通用预处理试剂。该试剂盒包含所有的预处理试剂：

- RNAscope® 过氧化氢（H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>）
- RNAscope® 靶标修复剂
- RNAscope® 蛋白酶 Plus
- RNAscope® 蛋白酶 IV
- 获取更多预处理试剂信息，请访问

[acdbio.com/pretreatment](https://acdbio.com/pretreatment)

### 步骤 02. 杂交

### RNAscope® 靶向探针 独有的探针设计确保了与靶标分子进行高度地特异性杂交。

#### RNAscope® 靶探针

我们采用专利 ACD RNAscope® 探针设计组合，设计了与目标 RNA 分子特异性杂交的双 Z 寡核苷酸探针池。

几乎针对所有组织类型中任何基因或基因组都可以设计探针。探针池由针对特定靶标精确设计的专有寡核苷酸构成（4-5 页）。每个靶探针池都包含一个特定的“颜色通道”标签，以便可以在显微镜特定通道下观察到相应靶标（12 页）。

目前我们的原位杂交靶探针种类已经超过 10000 种，既有编码 RNA，也有长链非编码 RNA (lncRNA)，您可以从中选择感兴趣的 RNA 探针。我们的 RNA ISH 探针跨越多个物种，包括人、小鼠、大鼠、狗、牛、斑马鱼、兔、猪、鸡、猴、HPV、HIV、HCV 等等。

搜索您感兴趣的目标基因探针，请访问

[acdbio.com/probesearch](https://acdbio.com/probesearch)

#### RNAscope® 定制靶探针

如果 ACD 探针目录中没有您感兴趣的基因，我们可以在两周内针对公开的或专有的序列为您定制新探针。ACD 探针设计组也可以满足非常规设计需求，如用于检测融合基因的探针，检测异种移植模型中生物标记物的探针，或其他用于任何物种的特殊定制。标准和非标准 RNA ISH 探针可适用于所有 RNAscope® 配套试剂盒，包括单染、双染、多重染色、手动或自动检测。

想要定制探针？告诉我们您的目的基因，我们可以随时订制：[acdbio.com/target-probes-made-order](https://acdbio.com/target-probes-made-order)



图 5 特异性高、重复性好的 RNAscope® 探针的简单快捷设计和生产流程

### 高质量控制为您的成功保驾护航

#### RNAscope® 对照探针

除了靶探针，我们还提供物种特异性管家基因阳性对照探针和 DapB 阴性对照探针，与 RNAscope® 试剂盒联合使用。阳性对照探针种类多样，表达水平由高到低，为 RNA ISH 提供了合适的实验对照，确保用于动态表达或未知表达水平的 RNA 检测数据具有高的可信性。查询物种特异性对照探针，请访问

[acdbio.com/controlprobes](https://acdbio.com/controlprobes)

#### RNAscope® 对照切片

检测条件的验证需要 RNAscope® 对照切片。首次实验时，在检测您的样本和靶探针之前，使用对照探针在对照切片中进行分析，作为技术质量控制检查，同时在每次分析实验中作为质量控制。我们提供两种对照切片：人 HeLa 细胞 FFPE 对照切片和小鼠 NIH 3T3 细胞的 FFPE 对照切片。

# RNAscope® 原位杂交手动检测

## 技术流程和相关产品

### 步骤 03. 扩增

### RNAscope® 试剂 实现从单重到四重分析的多元检测

#### RNAscope® 2.5 HD 棕色试剂盒

首次使用的用户理想的培训试剂盒，应用广泛。这一强大的检测试剂盒能提供高清晰度的永久染色效果，可永久保存。该分析中使用的色原二氨基联苯胺（DAB）是分子病理学的标准染色剂，适用于广泛的样品类型，并且在标准明场显微镜下即可观察。

该试剂盒是检测低表达靶基因（每个细胞含 1–20 个拷贝）的理想工具。该试剂盒有两种可选配置可用于全自动 ISH 分析：

- RNAscope® 2.5 VS 试剂盒（棕色）——用于罗氏 / Ventana 医疗系统公司的 DISCOVERY ULTRA 和 DISCOVERY XT 全自动组织染色系统
- RNAscope® 2.5 LS 试剂盒（棕色）——用于 Leica 生物系统公司的 BOND Rx 全自动组织染色系统。

获取更多自动化操作信息，请访问

[acdbio.com/automated-assays](http://acdbio.com/automated-assays)

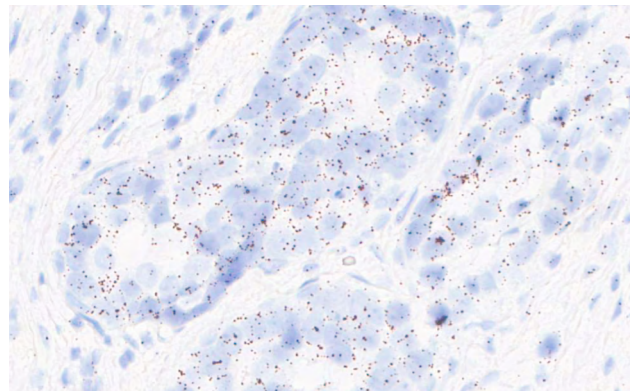


图 7. 使用 RNAscope® 2.5 HD 棕色试剂盒检测结肠癌 POLR2A mRNA 表达（棕色点）

#### RNAscope® 2.5 HD 红色试剂盒

采用一种固红染料，对比度更高，是 DAB 染色结果不理想的原位杂交的第一选择，如用于高度着色的肺、肝、视网膜和皮肤组织标本的染色。

此外，ACD 还推荐该试剂盒用于预期表达较低的靶基因的检测，因为红色点在苏木素染色中更显著，在标准明场显微镜下更容易识别。该试剂盒有两种可选配置可用于全自动 ISH 分析：

- RNAscope® 2.5 VS 试剂盒（红色）——用于罗氏 / Ventana 医疗系统公司的 DISCOVERY ULTRA 和 DISCOVERY XT 全自动组织染色系统
- RNAscope® 2.5 LS 试剂盒（红色）——用于徕卡生物系统公司的 BOND Rx 全自动组织染色系统。

获取更多自动化操作信息，请访问

[acdbio.com/automated-assays](http://acdbio.com/automated-assays)

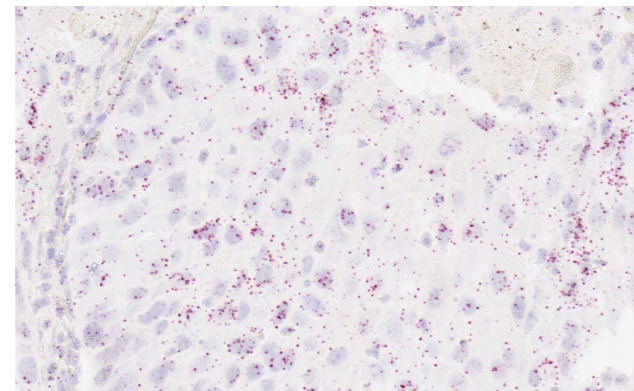


图 8. 使用 RNAscope® 2.5 HD 红色试剂盒检测肺癌组织 PDL1 mRNA 表达（红色点）

#### RNAscope® 双通道显色试剂盒

用于同时原位检测两个不同的 RNA。常见的应用包括共定位研究同一细胞环境内两个靶基因的表达（例如分泌配体及其受体）或表征某一标志物阳性（如干细胞标志物）的特定细胞类型中的基因表达。为了区分两种显色基团，ACD 将通道 1 (C1) 设定为绿色，通道 2 (C2) 设定为红色，因此 RNAscope® 探针名称中通常包括 C1 或 C2。染色切片在明场显微镜下即可观察。

获取更多 Leica 自动检测信息，请访问

[acdbio.com/automated-assays](http://acdbio.com/automated-assays)

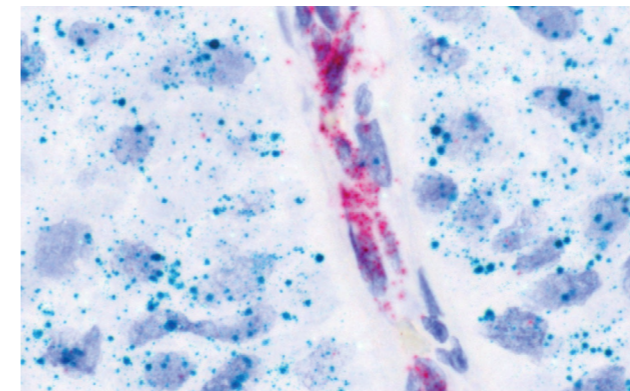


图 9. 使用 RNAscope® 双通道显色试剂盒检测人乳腺癌 FFPE 组织中 EPCAM1 (红点) 和 EGFR (绿点) 的表达

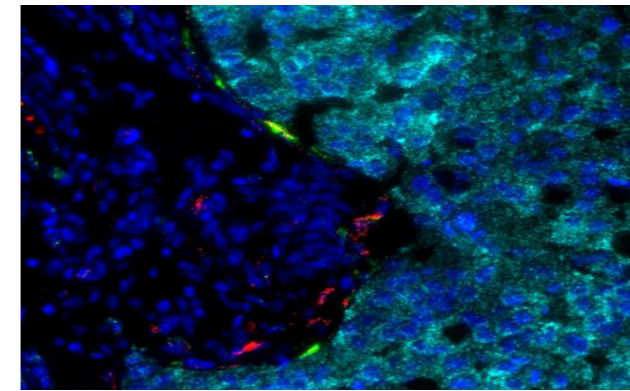


图 10. 使用 RNAscope® 多重荧光试剂盒检测 FFPE 乳腺癌组织中 panCK (浅绿色点), uPA (红点) 和 Pai-1 (绿点) 的表达

#### RNAscope® 多重荧光试剂盒

几乎适用于任何组织类型中任何基因集的共同定位研究，灵敏度极高，可同时进行一个、两个或三个不同靶 RNA 的单分子水平检测。每个靶探针池设计成用于 C1, C2 和 C3 三个颜色检测通道中的一个特定通道的探针。通过替代颜色模块，用户可以根据自己的实验设计将 C1, C2 和 C3 探针的颜色混合匹配。这种卓越的灵活性使之可以适用于不同水平的表达检测。ACD 可以定制 4 个通道探针，同时检测 4 个不同靶 RNA 的表达水平。该检测适用于所有类型的样本，但最理想的是新鲜冰冻组织切片。染色切片可以用多光谱荧光、共聚焦或标准荧光显微镜进行观察。RNAscope® 图像采用 Perkin Elmer 公司的 Nuance® 多光谱成像系统进行观察效果最佳。

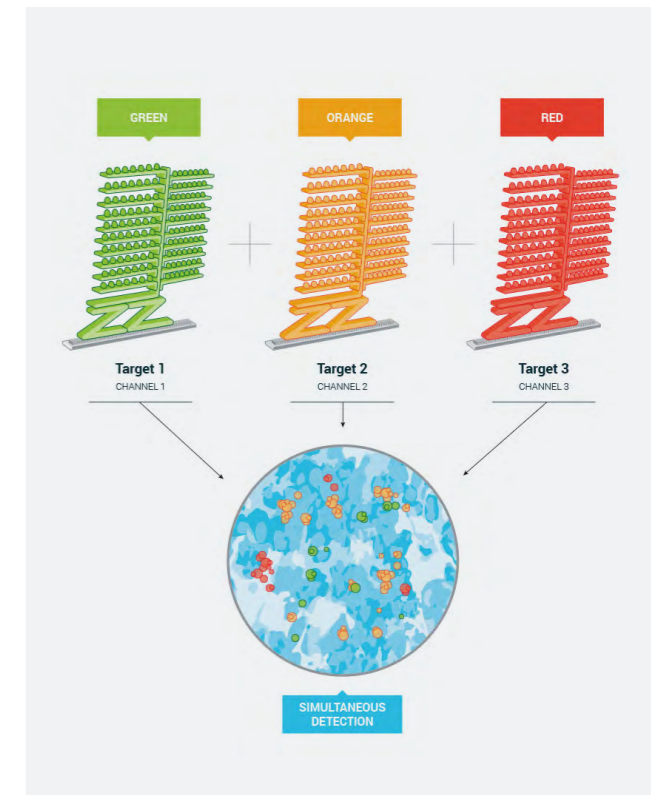


图 11. RNAscope® 多重荧光分析用于多重 RNA ISH 的分析

# RNAscope® 检测试剂盒选择指南

## 满足您的任何需求的 RNA ISH 方案

	RNAscope® 2.5 HD Assay-BROWN	RNAscope® 2.5 HD Assay-RED	RNAscope® 2-plex Assay	RNAscope® Multiplex Fluorescent Assay
检测类型	显色	显色	显色	荧光
所用染料	DAB	Fast Red	Fast Red HRP Green	FITC, Cy3, Cy5, Cy7
RNAscope® 探针 指定通道	通道 1 (C1探针)	通道 1 (C1探针)	通道 1&2 (C1&C2 探针)	通道 1-4 (C1, C2, C3&C4探针)
多重检测	单重	单重	单重、双重	单重、双重、三重、四重
关键优势	稳定、灵敏、永久染色；最常用的 RNAscope® 检测试剂盒	色彩明亮，与背景对比度高	采用两种不同的显色酶，从而避免两个通道的靶标显色时串色	采用 4 种不同的光谱通道，灵活性高
适用范围	用户首次操作，常规应用	适用于含有内源颜色背景的组织，如皮肤黑色素瘤、肝或吸烟者的肺	同时研究两种 RNA 标志物	适用于同时进行最多 4 种基因的共表达研究及要求灵活性的实验
新基因或表达水平未知基因的研究	+++++	+++++	+++	+++
归档样本	+++++	++	+++	++
显微镜成像系统	标准明场成像	标准明场成像	标准明场成像	多光谱荧光成像
样本类型	FFPE 组织 (TMAs) 固定冰冻组织 新鲜冰冻组织 培养细胞 PBMC	FFPE 组织 (TMAs) 固定冰冻组织 新鲜冰冻组织 培养细胞 PBMC	FFPE 组织 (TMAs) 固定冰冻组织 新鲜冰冻组织 培养细胞 PBMC	FFPE 组织 (TMAs) 固定冰冻组织 新鲜冰冻组织 培养细胞 PBMC
检测时长 (步骤1-3)	8 小时 (2 小时实验操作)	8 小时 (2 小时实验操作)	10 小时 (3 小时实验操作)	10 小时 (2 小时实验操作)

# RNAscope® 配件

## 温度和湿度优化以实现最佳检测性能

### HybEZ™ 杂交系统

我们推荐采用 HybEZ™ 杂交系统进行杂交和孵育步骤。HybEZ™ 杂交炉是一个操作简单的小巧台式炉，能严格控制 RNA ISH 的温度条件，是唯一一个经 ACD 验证，可以确保 RNAscope® 性能的杂交炉。为了实现最佳检测性能，HybEZ™ 杂交炉配有一个带有密封垫圈、温度可控的加湿盒。

在设定的温度和高湿度条件下，该仪器能同时容纳 20 张切片进行 RNAscope® FFPE 手动检测的杂交及其他孵育等步骤。

ACD HybEZ™ 杂交系统主要由 3 部分组成 (图 12)：

- HybEZ™ 杂交炉 (适用于 110V 和 220V)
- HybEZ™ 湿盒
- HybEZ™ 载玻片架

此外，还需要有 HybEZ™ 加湿纸，可以单独购买。

### RNAscope® EZ-Batch™ 切片处理系统

RNAscope® EZ-Batch™ 切片处理系统是为了提高手动检测操作效率而设计的，包括 RNAscope® EZ-Batch™ 载物片架和 EZ-Batch™ 清洗槽两部分。The RNAscope® EZ-Batch™ 载玻片架与 HybEZ™ 湿盒完全兼容，有一个很简单的锁定机制，避免在清洗过程中切片移动。该装置节省了清洗步骤中在载玻片架和 Tissue-Tek 清洗皿之间转移切片消耗的时间。每个 RNAscope® EZ-Batch™ 切片处理系统可以同时容纳 20 张切片。

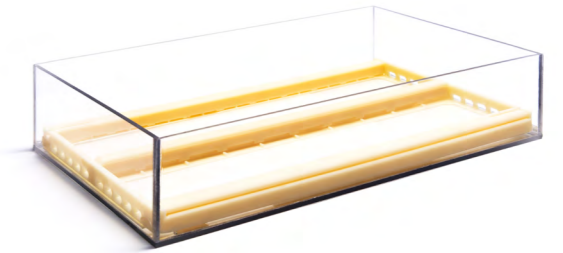


图 13. RNAscope® EZ-Batch™ 切片处理系统

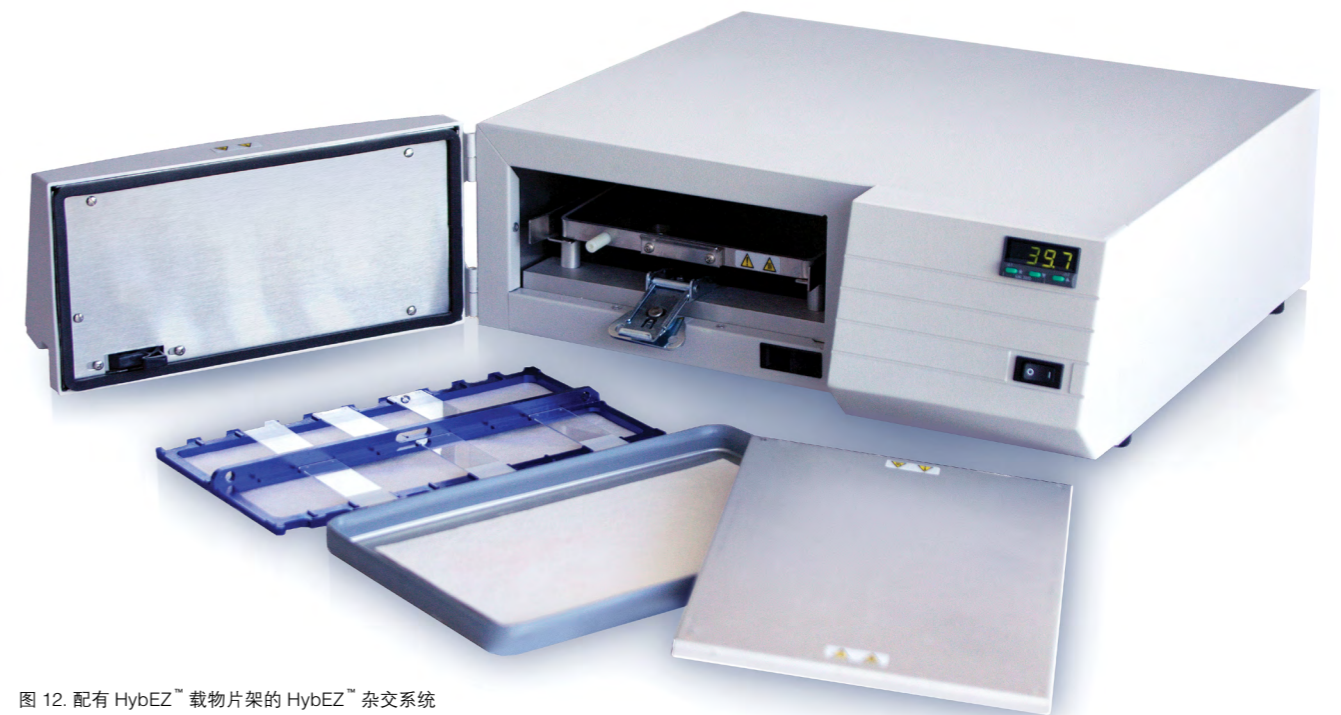


图 12. 配有 HybEZ™ 载物片架的 HybEZ™ 杂交系统

# RNAscope® 原位杂交手动检测 技术流程和相关产品 (续)

## 步骤 04. 成像

## 查看结果

每个信号点代表一个靶 RNA 分子，可以在显微镜下观察到 (图 14)

组织切片结果可以在 20–40X 的标准明场显微镜或标准荧光显微镜下查看，或者用多光谱荧光成像显微镜查看：

- 评估组织和细胞的形态和质量。
- 评估阳性对照信号强度。可以在 20–40X 显微镜下看到点状的阳性对照信号。
- 评估阴性对照背景。20X 视野下，每 10 个细胞有少于 1 个的 DAB 染色点，即为可接受结果。

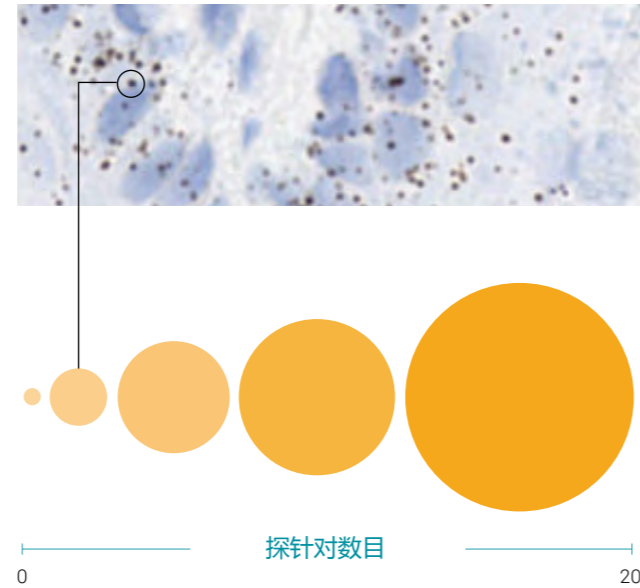


图 14. 大鼠食道 FFPE 组织中 *Ppib* 的检测 (棕色点)。每个棕色点信号代表一个靶 RNA 分子，信号点的大小与杂交到靶 RNA 分子上的双 Z 探针对数成正比

## 步骤 05. 定量

## 定量分析软件 精确定量触手可及

RNAscope® 检测技术的单分子灵敏度和可视化实现了 RNA ISH 的定量分析。为改善定量评分系统，ACD 公司与 Delfinens 公司和 Indica 实验室合作开发了自动分析软件——SpotStudio™ 和 HALO。这些先进的分析软件提供了客观准确的 RNA ISH 定量结果。病理学家可以在组织病理学环境中对基因表达进行定量和解读。

这些软件是为没有受过图像分析软件培训的病理学家而设计的，可以在几分钟内自动完成并提供标准化的客观结果。SpotStudio 软件可用于分析 RNAscope® 单一显色的数据；HALO 软件可用于分析 RNAscope® 单染、双染和荧光检测的数据。HALOTM 软件所有权归 Indica 实验室所有。

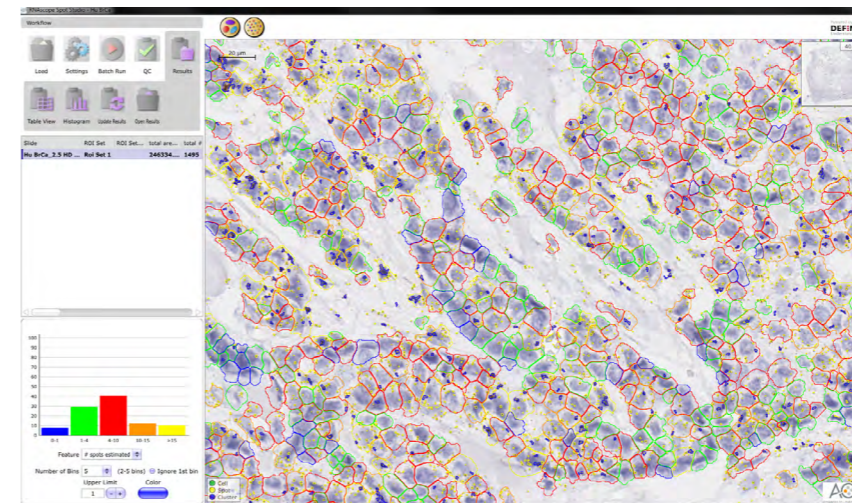


图 15. SpotStudio™ 软件分析人乳腺癌样本中 PPIB 的表达

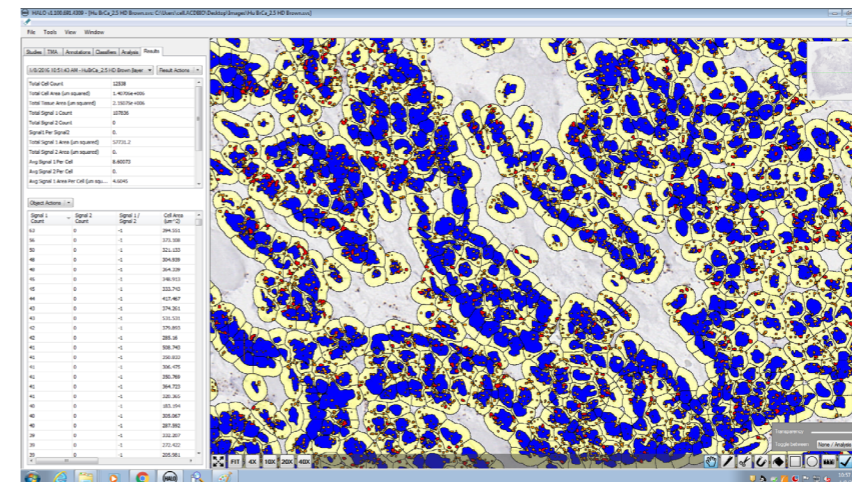


图 16. HALO™ 软件分析人乳腺癌组织中 PPIB 的表达

# ACD 公司技术支持提供 ISH 专业技术， 为您的成功保驾护航

## 完善的全球支持

无论您需要帮助选择靶标，还是决定哪种 RNA ISH 检测最符合您的需求，我们的全球技术和技术支持科学家可以帮助您选择合适的检测方法、设计您的实验并引导您获得成功的 RNA ISH 研究结果。

## 新用户项目


在您首次开展 RNA ISH 分析时，我们会提供为您独家提供一个新用户项目，从实验设计和开展到结果解析，全程为您引导。在我们的技术支持的帮助下，我们相信您首次分析即可获得可以发表的高质量结果。我们还为新老用户准备了每月一次的在线技术研讨会，详细解析手动染色、荧光和自动检测操作。您可以访问我们的网站，获取技术支持视频和录制的在线讲座：[acdbio.com/learn-more](http://acdbio.com/learn-more)


## 技术支持和现场培训

我们可以通过电话，电子邮件或上门服务，为您提供最佳的科学支持或指导，用户研究的不断改进让我们感到自豪。如果您希望我们的技术人员到您的实验室提供现场培训，请联系您的销售或客户经理。我们将尽早为您指派现场应用人员拜访您的实验室，进行短期访问和现场培训。


## 联系我们


北美地区 ACD 技术支持上班时间：太平洋标准时间  
7:30–18:00

 Email Support: [support@acdbio.com](mailto:support@acdbio.com)


 联系电话: 1-877-576-3636


欧洲 ACD 技术支持上班时间：中欧时间 8:00–18:00


 Email Support: [support@acdbio.com](mailto:support@acdbio.com)

 联系电话: +49 (0) 163 1520345

ACD中国子公司暨-爱兴德生物科技（北京）有限公司

 技术支持及订购邮箱: [info\\_china@acdbio.com](mailto:info_china@acdbio.com)

 免费服务电话: 400-966-1796

 北京市经济技术开发区西环南路26号院15号楼

了解更多关于RNAscope®检测的信息，请访问 [acdbio.com](http://acdbio.com)

仅限研究使用，不可用于诊断。  
RNAscope是Advanced Cell Diagnostics公司在美国和其他国家的注册商标。保留所有权利。  
©2016 Advanced Cell Diagnostics, Inc.  
Doc #: MK 51-06 4/Rev.A /Effective Date 03042016

