RNA FISH 试剂盒
（石蜡切片）说明书

如有疑问欢迎垂询
上海电话：021-51320195　　E-mail：support@genepharma.com
苏州电话：0512-86668828　　E-mail：szsupport@genepharma.com
http://www.genepharma.com

B037-V005-20230313

一、检测原理

RNA 荧光原位杂交(Fluorescence in Situ Hybridization)，简称为 RNA FISH，是一种重要的非放射性原位杂交技术。它的基本原理是：用已知的荧光染料标记单链核酸为探针，按照碱基互补配对原则，与待检测的 RNA 特异结合，二者经变性-退火-复性，即可形成靶 RNA 与核酸探针的杂交体，随后在荧光显微镜下对待测 RNA 进行相对定性、定量或定位分析。

二、组分和保存条件

成分	容量（50 tests）	容量（100 tests）	储存
Buffer C（20× SSC）	10 mL	20 mL	室温
Buffer D（去离子甲酰胺）	14 mL	28 mL	室温
Buffer E（杂交缓冲液）	8 mL	16 mL	室温
蛋白酶 K	20 μL	40 μL	-20℃
DEPC 水	6 mL	12 mL	-20℃
DAPI	25 μL	50 μL	-20℃

三、试剂配置

1. Buffer C 母液为 20×，用一级纯水（建议 DEPC 水）稀释成 2×使用；
2. 蛋白酶 K 用 2× Buffer C 1000 倍稀释；
3. 变性液配制：2× Buffer C 100 μL，Buffer D 700 μL，一级纯水（建议 DEPC 水）定容至 1 mL，每次新鲜配制；
4. 洗涤液配制：2× Buffer C 100 μL，Buffer D 500 μL，一级纯水（建议 DEPC 水）定容至 1 mL，每次新鲜配制；
5. DAPI 工作液：DAPI 原液用 PBS 1000 倍稀释，需避光保存和使用。

注意：

1. Buffer D 在通风橱使用；
2. 探针应避光稀释并保存，且实验过程中加入探针后的操作应在避光条件下进行；
3. 实验过程中常用试剂，如二甲苯请您自备；
4. 探针配制方法及保存请参考探针使用报告；
5. 以下操作中的反应时间、温度、Buffer 浓度及用量仅供参考，可根据具体情况优化。

四、实验方法

1. 脱蜡

1) 石蜡切片在 60ºC 烤箱中预热 30 min（预热时间建议根据不同样本进行适当增减）至石蜡融化；
2) 将切片浸入二甲苯 I，II 中各放置 10 min（建议在染缸中进行）；
3) 在梯度酒精中（100%、95%、90%、80%、70%）室温孵育各 10 min（建议在染缸中进行）；
4) PBS 洗切片两次，每次 2 min（建议在染缸中进行）。

2. 蛋白酶 K 消化

1) 蛋白酶 K 工作液预热至 37ºC；
2) 每张切片滴加蛋白酶 K 工作液 100 μL，37ºC 孵育 20 min（消化时间建议根据不同样本进行适当增减）；
3) 每张切片滴加 100 μL 2× Buffer C 在室温下漂洗切片 3 次，每次 1 min；
4) 梯度酒精 70%、80%、90%、100%脱水，每次 2 min，空气中干燥（建议在染缸中进行）。

3. 变性

1）78ºC 预热变性液；

2）每张切片滴加预热变性液 100 μL，78ºC 孵育 8 min；

3）梯度酒精 70%、80%、90%、100% 脱水，每次 2 min，空气中干

燥（建议在染缸中进行）。

4. 杂交

1) Buffer E 提前在 73ºC 水浴锅孵育 30 min，至澄清透亮；
2) 探针稀释：可参看标签或报告单上所示参数：nmole/OD_{260}，例如：nmole/OD_{260}= 4.17，则在每 OD 探针干粉制品中加入 41.7 μL 灭菌 DEPC 水，混匀后即得浓度约为 100 μM 的储存液，建议进行分装后避光储存于-20ºC，避免多次冻融操作；
3) 配制探针混合液：以 100 μL 探针混合液为例，即探针 X μL（可先做预实验确定所需的探针浓度，建议您使用时设置不同工作浓度梯度进行预实验，例：0.5 μM，1 μM，2 μM，4 μM，8 μM）加入 Buffer E，总体系 100 μL，73ºC 变性 5 min；
4) 准备湿盒，水平放置切片，每张切片滴加 100 μL 变性后的探针混合液，盖上盖玻片，用封片胶封片；
5) 置于原位杂交仪中，37ºC 孵育 12-16 h，注意保持湿度以防干片（若无杂交仪可滴加 100 μL 变性后的探针混合液，直接 37ºC 培养箱孵育 12-16 h）。

5. 杂交后水洗

1) 43ºC 预热洗涤液；
2) 轻轻去掉盖玻片，吸弃杂交溶液，每张切片滴加预热的洗涤液 100 μl 洗切片 15 min；

3) 每张切片滴加 2× Buffer C 100 μL（预热至 37ºC），洗 2 次，每次 10 min；

4) PBS 洗切片 1 次，10 min（建议在染缸中进行）。

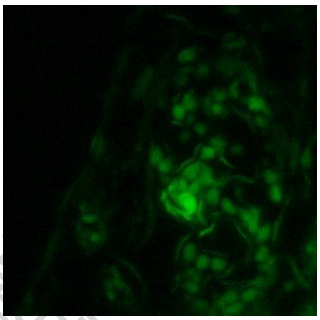
6. 细胞核染色

1) 每张切片加 100 μL 稀释后的 DAPI 工作液，在室温下避光孵育 10-20 min（根据样本的种类，建议适当调整 DAPI 的浓度及染色时间）；

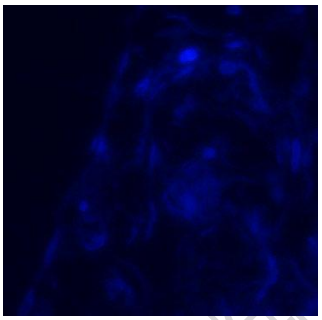
2) 吸弃 DAPI 工作液， PBS 洗切片 2 次，每次 2 min（建议在染缸中进行）；

3) 滴加抗淬灭剂，盖上盖玻片，封片胶封片于荧光显微镜下观察（建议 2 天内完成拍摄）。

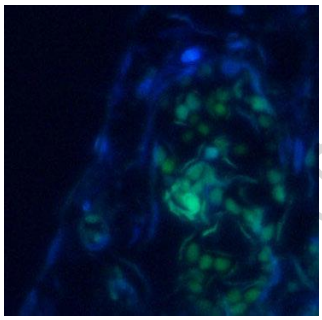
五、实验案例



绿光（FAM 标记探针杂交）



蓝光（DAPI 染核）



Merge