RNA FISH 试剂盒
SA-Biotin 系统
（冰冻切片）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

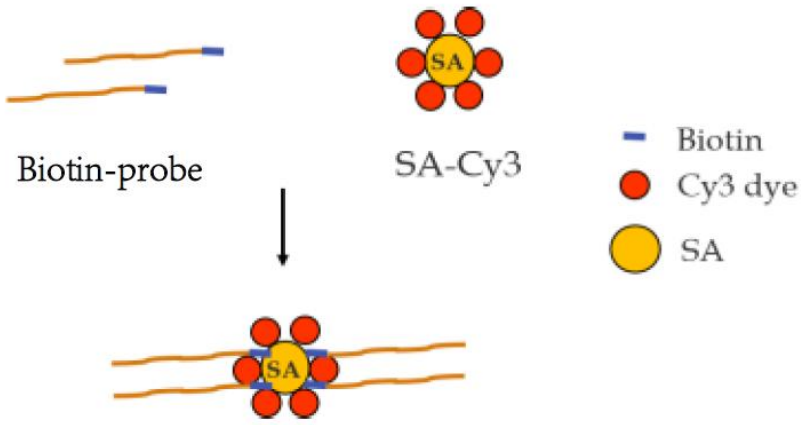
http://www.genepharma.com

B039-V004-20230313

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。传统的 RNA FISH，直接在 oligos 上标记荧光染料，根据碱基互补配对原则，与待检测的 RNA 特异结合，通过荧光显微镜检测荧光信号，该方法一般需要 20 个 oligos 以上，以便检测到较强较多的荧光信号点。

本系统中 SA（链霉亲和素蛋白）是一类四聚体蛋白，大小为 66 kDa，每一分子 SA 能够与四分子生物素进行高度特异性的结合，且两者之间的亲和力较强。应用该原理，我们将染料 Cy3 偶联到 SA 蛋白上，一分子 SA 能偶联上 6 个 Cy3；同时在探针上标记生物素，将两者在体外进行亲和连接，大约每个 SA 能与 4 条 Biotin-probe 结合，每个 SA 上有 6 个 Cy3，也就是每一条探针上连接了 6 个 Cy3，因此该方法具有一定的放大信号的作用。



SA-Biotin 系统原理示意图

二、组分和保存条件

成分	容量（50 tests）	容量（100 tests）	储存
Buffer B（枸橼酸缓冲液）	10 mL	20 mL	室温
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℃
封闭液	100 μL	200 μL	4℃
SA-Cy3	50 μL	100 μL	4℃

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 工作液：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. 封闭液为母液，100 μL 封闭液用 1× PBS（PBS 建议用 DEPC 水配制）定容至 5 mL 后可直接使用，4ºC 保存；
5. SA-Cy3 浓度为 1 μM，即用型试剂；
6. 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；
7. 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请您自备；
4) 实验过程中试剂建议用 DEPC 水配制；
5) 探针配制方法及保存请参考探针使用报告；
6) 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. 复水

1) 冰冻切片取出，每张切片滴加 Buffer B 100 μL，室温放置 15 min；
2) 吸弃 Buffer B，PBS 洗切片两次，每次 5 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（消化时间请根据不同样本进行调整）；
3) 吸弃蛋白酶 K ，每张切片滴加 100 μL 1× 封闭液，37ºC 30 min；
4) 吸弃 1× 封闭液，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。

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) 配制探针工作液：将探针储存液稀释至 1 μM，放入 75ºC 水浴锅变性 10 min，然后与 SA-Cy3 按比例加入到 PBS，（以 10 μL 体系为例，即 1 μL 1 μM Biotin-probe + 1 μL 1 μM SA-Cy3 + 8 μL PBS），37ºC 孵育 30 min (可做预实验确定探针和 SA-Cy3 的比例，例如 1:1，2:1，4:1，8:1 等)；
4) 将上述 10 μL 探针工作液和 90 μL Buffer E 混匀；
5) 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；
6) 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）。

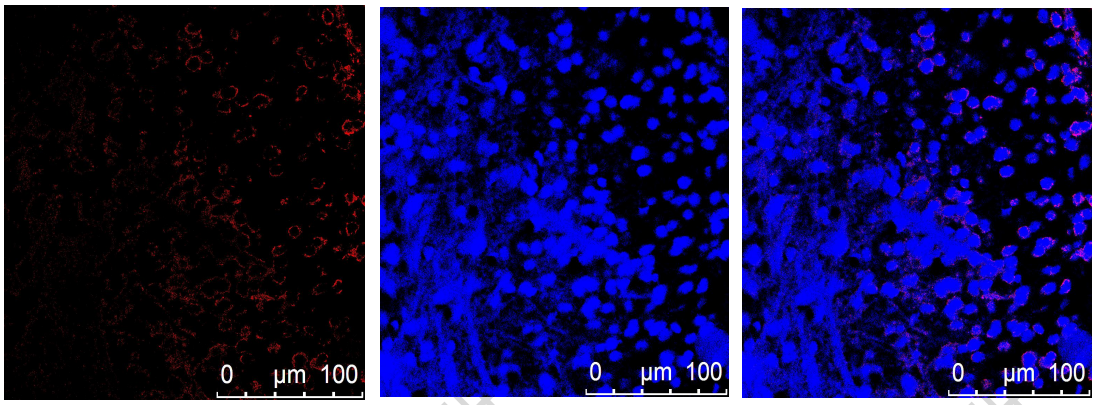
5. 杂交后水洗

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 ，60ºC 洗 3 次，每次 10 min；
4) 吸弃 2× Buffer C，每张切片滴加 100 μL 的 2× Buffer C，置于 37ºC 洗涤 10 min，洗涤 3 次（如果背景深时，建议适当提高洗涤温度及次数）。

6. 细胞核染色

1) 每张切片加 100 μL 稀释好的 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



红光（Cy3 标记探针杂交）　蓝光（DAPI 染核）　Merge