



GenePharma

股票代码: 430601

吉玛基因

www.genepharma.com

RNA 荧光原位杂交试剂盒 (冰冻切片定位用) 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>



B077-V002-20241224

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。基本原理是: 用已知的荧光素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、定量或相对定位分析。

二、 组分和保存条件

成分	容量 (50 tests)	储存
Buffer B (枸橼酸缓冲液)	10 mL	室温
Buffer C (20× SSC)	10 mL	室温
Buffer D (去离子甲酰胺)	14 mL	室温
Buffer E (杂交缓冲液)	8 mL	室温
蛋白酶 K	20 μ L	-20°C
DEPC 水	6 mL	-20°C
DAPI	25 μ L	-20°C
阳性对照探针	1 OD	-20°C
阴性对照探针	1 OD	-20°C
靶标探针	2 OD	-20°C

三、 试剂配制

1. Buffer C 母液为 20 $\times$, 用一级纯水 (建议 DEPC 水) 稀释成 2 $\times$ 使用;
2. 蛋白酶 K 工作液: 蛋白酶 K 用 2 $\times$ Buffer C 按照 1:1000 稀释;
3. 变性液配制: 2 $\times$ Buffer C 400 μ L, Buffer D 2800 μ L, 一级纯水 (建议 DEPC 水) 定容至 4 mL, 每次新鲜配制;
4. 杂交后水洗液配制: 2 $\times$ Buffer C 400 μ L, Buffer D 2000 μ L, 一级纯水 (建议 DEPC 水) 定容至 4 mL, 每次新鲜配制;
5. DAPI 工作液: 用 PBS 按照 1:1000 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 PBS 缓冲液、乙醇、抗荧光猝灭剂等请您自备;



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. 复水

- 1) 冰冻切片取出, 每张切片滴加 Buffer B 100 μ L, 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 37°C;
- 2) 每张切片滴加蛋白酶 K 工作液 100 μ L, 37°C 孵育 20 min(消化时间请根据不同样本进行调整);
- 3) 每张切片滴加 2 $\times$ Buffer C 100 μ L 在室温下漂洗切片 3 次, 每次 1min;
- 4) 梯度酒精 70%、80%、90%、100% 脱水, 每次 2 min, 空气中干燥。

3. 变性

- 1) 78°C 预热变性液;
- 2) 每张切片滴加预热变性液 100 μ L, 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 73°C 水浴锅孵育 30 min, 至澄清透亮;
- 2) 探针稀释: 探针稀释可参看标签或报告单上所示参数: nmole/OD260, 例如: nmole/OD260=4.17, 则在每 OD 探针干粉制品中加入 41.7 μ L 灭菌 DEPC 水, 混匀后即得浓度约为 100 μ M 的储存液, 建议进行分装后避光储存于 -20°C, 避免多次冻融操作;
- 3) 配制探针混合液: 以 100 μ L 探针混合液为例, 即探针 X μ L (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 μ M, 1 μ M, 2 μ M, 4 μ M, 8 μ M) 加入 Buffer E, 总体积 100 μ L, 73°C 变性 5 min;
- 4) 准备湿盒, 水平放置切片, 每张切片滴加 100 μ L 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, 37°C 孵育 12-16 h (若无杂交仪可滴加 100 μ L 变性后的探针混合液, 直接 37°C 培养箱孵育 12-16 h)。

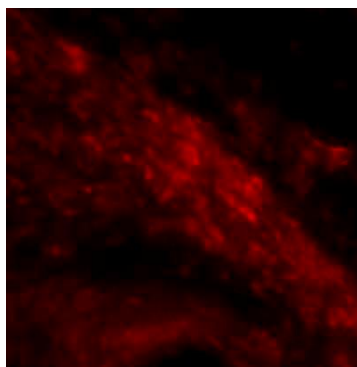
5. 杂交后水洗

- 1) 43°C 预热杂交后水洗溶液;
- 2) 轻轻去掉盖玻片, 吸弃杂交溶液, 每张切片滴加预热的杂交后水洗溶液 100 μ L, 43°C洗切片 15 min;
- 3) 每张切片滴加 2 $\times$ Buffer C (预热至 37°C) 100 μ L 洗 2 次, 每次 10 min;
- 4) PBS 洗切片 1 次, 10 min (建议在染缸中进行)。

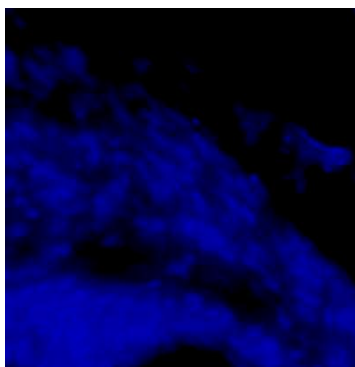
6. 细胞核染色

- 1) 每张切片加 100 μ L 稀释好的 DAPI 工作液, 在室温下避光孵育 20 min;
- 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) 滴加甘油或抗荧光猝灭剂, 盖上盖玻片, 封片胶封片, 于荧光显微镜下观察。

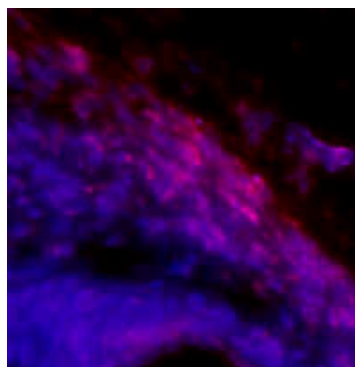
五、 实验案例



红光 (CY3 标记探针杂交)



蓝光 (DAPI 染核)



MERGE