



GenePharma

股票代码: 430601

吉玛基因

www.genepharma.com

RNA 荧光原位杂交试剂盒-P3 (细胞爬片定位用) 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>



B091-V001-20241224

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。它的基本原理是：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、定量或定位分析。

二、组分和保存条件

成分	容量（50 tests）	储存
Buffer A（TritonX-100）	30 μ L	室温
Buffer C（20 $\times$ SSC）	6 mL	室温
Buffer E（杂交缓冲液）	8 mL	室温
Buffer F（Tween 20）	50 μ L	室温
DEPC 水	6 mL	-20 $^{\circ}$ C
DAPI	15 μ L	-20 $^{\circ}$ C
阳性对照探针	1 OD	-20 $^{\circ}$ C
阴性对照探针	1 OD	-20 $^{\circ}$ C
靶标探针	2 OD	-20 $^{\circ}$ C

三、试剂配制

- 0.1% Buffer A 配制：PBS 999 μ L，Buffer A 1 μ L，且每次新鲜配制；
- Buffer C 母液为 20 $\times$ ，用一级纯水稀释成 4 $\times$ 、2 $\times$ 或 1 $\times$ 使用；
- 0.1% Buffer F 配制：4 $\times$ Buffer C 999 μ L，Buffer F 1 μ L，且每次新鲜配制；
- DAPI 工作液：用 PBS 按照 1:1000 稀释，需避光保存和使用。

注意：

- 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。
- 实验过程中常用试剂，如多聚甲醛、PBS 缓冲液、抗荧光猝灭剂等请您自备。
- 探针配制方法及保存请参考探针使用报告。
- 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

4.1 贴壁细胞（以 48 孔板为例）

1. 按照 1×10^4 细胞/孔的密度将贴壁细胞接种于 48 孔板（孔内提前放入已处理好的且大小合适的盖玻片）中（建议事先铺在 Confocal 专用培养皿中），于培养箱中培养过夜；
2. 吸弃培养基，PBS 洗两次，每次 5 min；
3. 吸弃 PBS，每孔加入 100 μ L 4%多聚甲醛，室温固定 15 min；
4. 吸弃 4%多聚甲醛，每孔加入 100 μ L 0.1% Buffer A（现用现配）室温处理细胞 15 min；
5. 吸弃 0.1% Buffer A，PBS 洗两次，每次 5 min；
6. 吸弃 PBS，每孔加入 100 μ L $2 \times$ Buffer C，37°C 培养箱放置 30 min；
7. Buffer E 提前在 73°C 水浴锅孵育 30 min，至澄清透亮；
8. 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；
9. 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，总体系 100 μ L，73°C 变性 5 min；
10. 吸弃 $2 \times$ Buffer C，每孔加入 100 μ L 变性后的探针混合液，采取避光措施后置于 37°C 培养箱中杂交过夜；
11. 杂交次日，将样本从 37°C 培养箱取出，吸弃探针混合液，每孔加入 100 μ L 42°C 预热的 0.1% Buffer F 洗涤 5 min；
12. 吸弃 0.1% Buffer F，每孔加入 100 μ L 42°C 预热的 $2 \times$ Buffer C 洗涤 5 min；
13. 吸弃 $2 \times$ Buffer C，每孔加入 100 μ L 42°C 预热的 $1 \times$ Buffer C 洗涤 5 min，吸弃洗涤液
14. 每孔加入 200 μ L 稀释后的 DAPI 工作液，避光染色 20 min；
15. 吸弃 DAPI 工作液，PBS 洗涤 2 次，每次 5 min；
16. 滴加甘油或抗荧光猝灭剂于干净的载玻片，将细胞爬片细胞面朝下盖在载玻片上，于荧光显微镜下观察（封片胶封片可延长爬片保存时间，1 周内完成拍摄）。

4.2 悬浮细胞

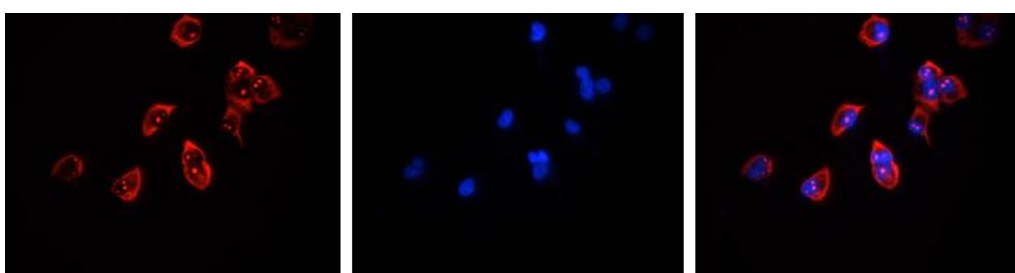
1. 将悬浮细胞固定在玻片上:
 - a) 方法一: 用甩片机使固定于 4%多聚甲醛的悬浮细胞贴在玻片(多聚赖氨酸处理)上;
 - b) 方法二: 涂片, 将细胞悬液滴在多聚赖氨酸处理过的载玻片上, 另取一片载玻片做推片, 将推片自细胞滴左侧向右移动, 当细胞滴均匀地附着在两片之间时, 再将推片向左平稳地移动(两片成 30~40 度夹角)推出均匀的细胞膜, 于酒精灯上过几次烤干;
2. 将烤干的细胞涂片置于 10 cm dish 中, 滴加 100 μ L 0.1% Buffer A (现用现配) 室温处理细胞 15 min;
3. 吸弃 0.1% Buffer A, 滴加 PBS 洗两次, 每次 5 min;
4. 吸弃 PBS, 滴加 100 μ L 2 $\times$ Buffer C, 37 $^{\circ}$ C 培养箱放置 30 min;
5. Buffer E 提前在 73 $^{\circ}$ C 水浴锅孵育 30 min, 至澄清透亮;
6. 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 $^{\circ}$ C, 避免多次冻融操作;
7. 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 $^{\circ}$ C 变性 5 min;
8. 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;
9. 置于原位杂交仪中, 37 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C 培养箱孵育 12-16 h);
10. 杂交次日, 将样本从 37 $^{\circ}$ C 培养箱取出, 轻轻去掉盖玻片, 吸弃探针混合液, 每张玻片滴加 100 μ L 42 $^{\circ}$ C 预热的 0.1% Buffer F 洗涤 5 min;
11. 吸弃 0.1% Buffer F, 每张玻片滴加 100 μ L 42 $^{\circ}$ C 预热的 2 $\times$ Buffer C 洗涤 5 min;
12. 吸弃 2 $\times$ Buffer C, 每张玻片滴加 100 μ L 42 $^{\circ}$ C 预热的 1 $\times$ Buffer C 洗涤 5 min, 吸弃洗涤液, 于室温干燥;

13. 每张玻片滴加 100 μ L 稀释后的 DAPI 工作液, 避光染色 20 min;
14. 吸弃 DAPI 工作液, 每张玻片滴加 100 μ L PBS 洗 2 次, 每次 2 min;
15. 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

5.1 贴壁细胞爬片

5.1.1 lncRNA

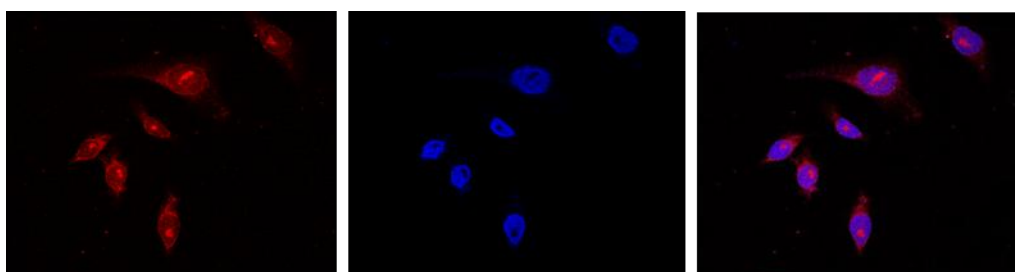


红光 (CY3 标记探针杂交)

蓝光 (DAPI 染核)

MERGE

5.1.2 miRNA

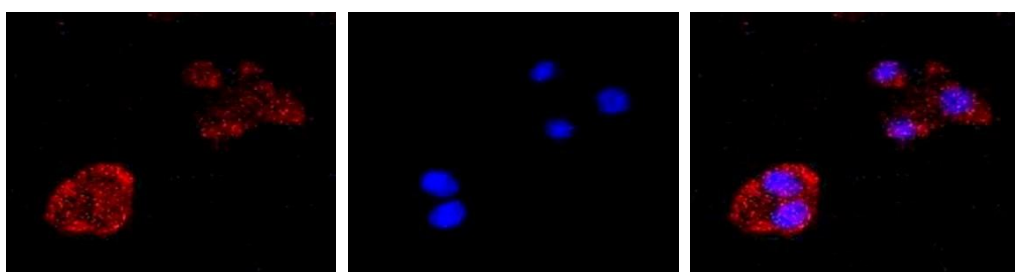


红光 (CY3 标记探针杂交)

蓝光 (DAPI 染核)

MERGE

5.1.3 mRNA



红光 (CY3 标记探针杂交)

蓝光 (DAPI 染核)

MERGE



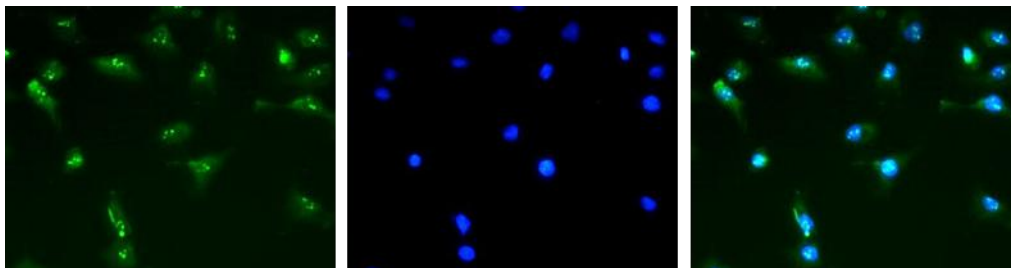
GenePharma

股票代码: 430601

吉玛基因

www.genepharma.com

5.1.4 circRNA

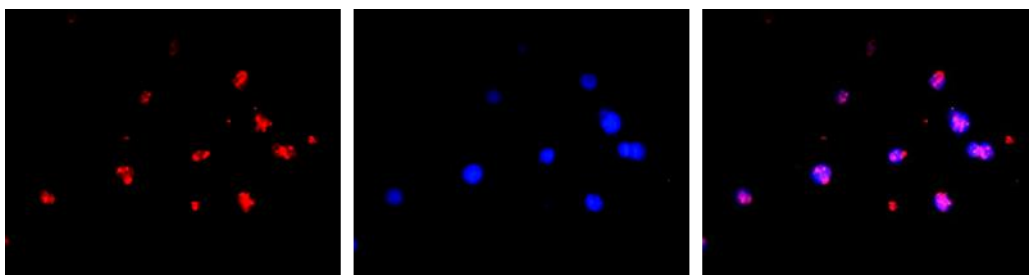


绿光 (FAM 标记探针杂交)

蓝光 (DAPI 染核)

MERGE

5.2 悬浮细胞烤片 (lncRNA)



红光 (CY3 标记探针杂交)

蓝光 (DAPI 染核)

MERGE