



GenePharma

股票代码: 430601

吉玛基因

www.genepharma.com

# RNA 荧光原位杂交试剂盒 (细胞爬片定量用) 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>



B080-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 $\mu$ L	室温
Buffer C (20 $\times$ SSC)	6 mL	室温
Buffer D (去离子甲酰胺)	14 mL	室温
Buffer E (杂交缓冲液)	1 mL	-20 $^{\circ}$ C
Buffer F (Tween 20)	50 $\mu$ L	室温
DEPC 水	6 mL	室温
DAPI	15 $\mu$ L	-20 $^{\circ}$ C
抗荧光猝灭剂	300 $\mu$ L	室温
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
Amplification Probe	1 OD	-20 $^{\circ}$ C
Imager Probe	1 OD	-20 $^{\circ}$ C

## 三、试剂配制

- 0.1% Buffer A 配制：1 $\times$  PBS 999  $\mu$ L， Buffer A 1  $\mu$ 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  $\mu$ L， Buffer F 1  $\mu$ L，且每次新鲜配制；
- DAPI 工作液：用1 $\times$  PBS 按照1:1000 稀释，需避光保存和使用；
- 杂交洗涤液 1：取 100  $\mu$ L Buffer C， 1  $\mu$ L Buffer F，加入到 900  $\mu$ L DEPC 水，且每次新鲜配制；
- 杂交洗涤液 2：取 100  $\mu$ L Buffer C， 1  $\mu$ L Buffer F，200  $\mu$ L Buffer D，加入到 700  $\mu$ L DEPC 水，且每次新鲜配制。

**注意：**



1. 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；
2. 实验过程中常用试剂，如多聚甲醛、PBS 缓冲液、BSA 等请您自备；
3. 探针配制方法及保存请参考探针使用报告；
4. 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 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  $\mu\text{L}$  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 1 $\times$  PBS 洗两次，每次 5 min；
4. 一次杂交
  - a) Buffer E 提前在 65  $^{\circ}\text{C}$  水浴锅孵育 30 min，至澄清透亮；
  - b) 探针稀释：探针稀释可参看标签或报告单上所示参数：nmole/OD<sub>260</sub>，例如：nmole/OD<sub>260</sub>= 4.17，则在每 OD 探针干粉制品中加入 41.7  $\mu\text{L}$  灭菌 DEPC 水，混匀后即得浓度约为 100  $\mu\text{M}$  的储存液，建议进行分装后避光储存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ ，避免多次冻融操作；
  - c) 配制探针混合液：

Hybridization Probe (10 $\mu\text{M}$ )	Buffer E	Buffer D	DEPC 水
1 $\mu\text{L}$	25 $\mu\text{L}$	34 $\mu\text{L}$	40 $\mu\text{L}$

- d) 准备湿盒，水平放置切片，每张切片滴加 10  $\mu\text{L}$  变性后的探针混合液，盖上盖玻片，用封片胶封片；



- e) 置于原位杂交仪中, 65 °C 变性 3 min , 然后 37 °C 孵育 12-16 h (若无杂交仪可滴加 100  $\mu$ L 变性后的探针混合液, 直接 37 °C 培养箱孵育 12-16 h);
- f) 去除封片胶, 加入杂交洗涤液 1, 室温洗涤 2 min, 重复 2 次;

## 5. 二次杂交

- a) 二次杂交工作液配制:

Amplification Probe (10 $\mu$ M)	Buffer E	Buffer D	DEPC 水
1 $\mu$ L	25 $\mu$ L	34 $\mu$ L	40 $\mu$ L

- b) 滴加 10  $\mu$ L 二次杂交工作液, 盖上盖玻片, 封上封片胶, 37 °C 杂交 1.5 h;
- c) 去除封片胶, 加入杂交洗涤液 2, 室温洗涤 2 min, 重复 2 次;

## 6. 荧光杂交:

- a) 5%牛血清白蛋白 (BSA) 溶液, 室温封闭 1 h;
- b) 1 $\times$  PBS, 室温洗涤 5 min, 吸弃液体;
- c) 滴加 10  $\mu$ L 荧光杂交工作液, 盖上盖玻片, 封上封片胶, 30 °C 孵育 1 h;

荧光杂交工作液配制:

Imager Probe(10 $\mu$ M)	10 $\times$ PBS	DEPC 水
10 $\mu$ L	10 $\mu$ L	80 $\mu$ L

- d) 去除封片胶, 放入预热好的 1 $\times$  PBS, 37 °C 洗涤 5 min ;
- e) 加入预热好的 1 $\times$  PBS, 37 °C 洗涤 2 min , 重复 2 次。

## 7. 细胞核染色

- a) 每张切片加 100  $\mu$ L 稀释后的 DAPI 工作液, 在室温下避光孵育 20 min;
- b) 吸弃 DAPI 工作液, 1 $\times$  PBS 洗切片 2 次, 每次 2 min (建议在染缸中进行);
- c) 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。

## 4.2 贴壁细胞 (以 48 孔板为例)

- 按照 1 $\times$ 10<sup>4</sup> 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;
- 吸弃培养基, 1 $\times$  PBS 洗两次, 每次 5 min;
- 吸弃 1 $\times$  PBS, 每孔加入 100  $\mu$ 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  $\mu\text{L}$  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. 一次杂交
  - a) Buffer E 提前在 65  $^{\circ}\text{C}$  水浴锅孵育 30 min，至澄清透亮;
  - b) 探针稀释：探针稀释可参看标签或报告单上所示参数：nmole/OD<sub>260</sub>，例如：nmole/OD<sub>260</sub>= 4.17，则在每 OD 探针干粉制品中加入 41.7  $\mu\text{L}$  灭菌 DEPC 水，混匀后即得浓度约为 100  $\mu\text{M}$  的储存液，建议进行分装后避光储存于-20  $^{\circ}\text{C}$ ，避免多次冻融操作;
  - c) 配制探针混合液:

Hybridization Probe (10 $\mu\text{M}$ )	Buffer E	Buffer D	DEPC 水
1 $\mu\text{L}$	25 $\mu\text{L}$	34 $\mu\text{L}$	40 $\mu\text{L}$

- d) 配制好的探针 65 $^{\circ}\text{C}$  变性 3min，然后每孔加入 200 $\mu\text{L}$  探针混合液;37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 12-16h;
  - e) 加入杂交洗涤液 1，室温洗涤 2 min，重复 2 次;
7. 二次杂交

- a) 二次杂交工作液配制:

Amplification Probe (10 $\mu\text{M}$ )	Buffer E	Buffer D	DEPC 水
1 $\mu\text{L}$	25 $\mu\text{L}$	34 $\mu\text{L}$	40 $\mu\text{L}$

- b) 每孔加入 200  $\mu\text{L}$  二次杂交工作液，37  $^{\circ}\text{C}$  杂交 1.5 h;
  - c) 加入杂交洗涤液 2，室温洗涤 2 min，重复 2 次;
8. 荧光杂交:

- a) 5%牛血清白蛋白 (BSA) 溶液，室温封闭 1 h;
- b) 1 $\times$  PBS，室温洗涤 5 min，吸弃液体;
- c) 每孔加入 200  $\mu\text{L}$  荧光杂交工作液，30  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h;

荧光杂交工作液配制:

Imager Probe(10 $\mu\text{M}$ )	10 $\times$ PBS	DEPC 水
10 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$	80 $\mu\text{L}$

- d) 加入预热好的 1 $\times$  PBS，37  $^{\circ}\text{C}$  洗涤 5 min;
- e) 加入预热好的 1 $\times$  PBS，37 $^{\circ}\text{C}$  洗涤 2 min，重复 2 次;



## 9. 细胞核染色

- 每孔加入 200  $\mu$ L 稀释后的 DAPI 工作液, 在室温下避光孵育 20 min;
- 吸弃 DAPI 工作液, 1 $\times$  PBS 洗 2 次, 每次 2 min (建议在染缸中进行);
- 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 细胞系 MCF7 基因 mRNA-Her2

