



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>



B076-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。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 B (枸橼酸缓冲液)   | 10 mL         | 室温    |
| Buffer C (20×SSC)   | 10 mL         | 室温    |
| Buffer D (甲酰胺)      | 14 mL         | 室温    |
| Buffer E (杂交缓冲液)    | 1 mL          | 室温    |
| 蛋白酶 K               | 20 $\mu$ L    | -20°C |
| DEPC 水              | 6 mL          | -20°C |
| DAPI                | 25 $\mu$ L    | -20°C |
| 抗荧光猝灭剂              | 300 $\mu$ L   | 室温    |
| 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 |
| Amplification Probe | 1 OD          | -20°C |
| Imager Probe        | 1 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  $\mu$ L, Buffer D 2800  $\mu$ 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  $\mu$ L, Buffer D 2000  $\mu$ 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。



GenePharma

股票代码: 430601

吉玛基因

www.genepharma.com

**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、BSA、PBS、乙醇等请您自备;
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  $\mu$ 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  $\mu$ L, 37°C 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  $\mu$ L 2 $\times$  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) 78 °C 预热变性液;
- 2) 每张切片滴加预热变性液 100  $\mu$ L, 78°C 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. 一次杂交

- 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/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  $\mu$ L 灭菌 DEPC 水, 混匀后即得浓度约为 100  $\mu$ 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:



GenePharma

股票代码: 430601

吉玛基因

www.genepharma.com

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

- 4) 准备湿盒, 水平放置切片, 每张切片滴加 10  $\mu$ L 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, 65  $^{\circ}$ C 变性 3 min, 然后 37  $^{\circ}$ 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  $^{\circ}$ C 培养箱孵育 12-16 h)。

## 5. 杂交后水洗

- 1) 43  $^{\circ}$ 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  $\mu$ L 洗切片 15 min;
- 3) 每张切片滴加 2 $\times$  Buffer C 100  $\mu$ L (预热至 37  $^{\circ}$ C), 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. 二次杂交

- 1) 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 |

- 2) 滴加 10  $\mu$ L 二次杂交工作液, 盖上盖玻片, 封上封片胶, 37  $^{\circ}$ C 杂交 1.5 h;
- 3) 加入杂交后水洗液, 室温洗涤 2 min, 重复 2 次;

## 7. 荧光杂交

- 1) 5%牛血清白蛋白 (BSA) 溶液, 室温封闭 1 h;
- 2) 1 $\times$  PBS, 室温洗涤 5 min, 吸弃液体;
- 3) 滴加 10  $\mu$ L 荧光杂交工作液, 盖上盖玻片, 封上封片胶, 30 $^{\circ}$ 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 |

- 4) 去除封片胶, 放入预热好的 1 $\times$  PBS, 37 $^{\circ}$ C 洗涤 5min ;
- 5) 加入预热好的 1 $\times$  PBS, 37 $^{\circ}$ C 洗涤 2min, 重复 2 次。



GenePharma

股票代码: 430601

吉玛基因

www.genepharma.com

## 8. 细胞核染色

- 1) 每张切片加 100  $\mu\text{L}$  稀释后的 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。