



GenePharma

股票代码: 430601

吉玛基因

www.genepharma.com

小 RNA 荧光原位杂交试剂盒 (石蜡切片定量用) 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>



B084-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 C (20× SSC)	10 mL	室温
Buffer D (甲酰胺)	14 mL	室温
Buffer E (杂交缓冲液)	8 mL	室温
蛋白酶 K	20 μL	-20 °C
DEPC 水	6 mL	-20 °C
DAPI	25 μL	-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
Amplification Probe	1 OD	-20 °C
Imager Probe	1 OD	-20 °C
抗荧光猝灭剂	300 μL	室温

三、试剂配制

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 按照 1:1000 稀释；
3. 变性液配制：2× Buffer C 400 μL，Buffer D 2800 μL，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× Buffer C 400 μL，Buffer D 2000 μL，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；



GenePharma

股票代码: 430601

吉玛基因

www.genepharma.com

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 缓冲液、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. 脱蜡

- 1) 石蜡切片在 60 °C 烤箱中预热 30 min (预热时间建议根据不同样本进行适当增减) 至石蜡融化;
- 2) 将切片浸入二甲苯 I, II 中各放置 10 min (建议在染缸中进行);
- 3) 在梯度酒精中 (100%、95%、90%、80%、70%) 室温孵育各 10 min (建议在染缸中进行);
- 4) PBS 洗切片两次, 每次 2 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 (消化时间建议根据不同样本进行适当增减);
- 3) 每张切片滴加 100 μ 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 μ 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/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:

Hybridization Probe (10 μ M)	Buffer E	Buffer D	DEPC 水
1 μ L	25 μ L	34 μ L	40 μ L

4) 准备湿盒, 水平放置切片, 每张切片滴加 10 μ 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 μ 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 μ L 洗切片 15 min;

3) 每张切片滴加 2 $\times$ Buffer C 100 μ 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 μ M)	Buffer E	Buffer D	DEPC 水
1 μ L	25 μ L	34 μ L	40 μ L

2) 滴加 10 μ 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) 去除封片胶, 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 μ 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 μ M)	10 $\times$ PBS	DEPC 水
10 μ L	10 μ L	80 μ L

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

5) 加入预热好的 1 $\times$ PBS, 37 $^{\circ}$ C 洗涤 2 min, 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 μ 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。

五、实验案例

5.1 组织 ASO 药物

