RNA FISH 试剂盒
SA-Biotin 系统
（细胞爬片）说明书

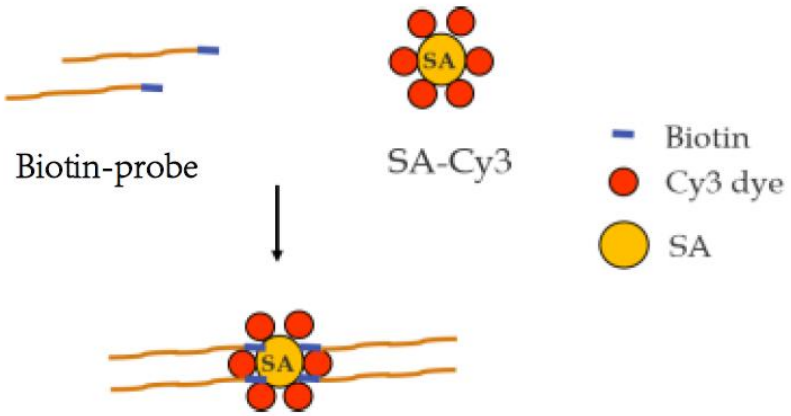
如有疑问欢迎垂询
上海电话：021-51320195　　E-mail：support@genepharma.com
苏州电话：0512-86668828　　E-mail：szsupport@genepharma.com
http://www.genepharma.com

B038-V004-20230313

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。传统的 RNA FISH，直接在 oligos 上标记荧光染料，根据碱基互补配对原则，与待检测的 RNA 特异结合，通过荧光显微镜检测荧光信号，该方法一般需要 20 个 oligos 以上，以便检测到较强较多的荧光信号点。

本系统中 SA（链霉亲和素蛋白）是一类四聚体蛋白，大小为 66 kDa，每一分子 SA 能够与四分子生物素进行高度特异性的结合，且两者之间的亲和力较强。应用该原理，我们将染料 Cy3 偶联到 SA 蛋白上，一分子 SA 能偶联上 6 个 Cy3；同时在探针上标记生物素，将两者在体外进行亲和连接，大约每个 SA 能与 4 条 Biotin-probe 结合，每个 SA 上有 6 个 Cy3，也就是每一条探针上连接了 6 个 Cy3，因此该方法具有一定的放大信号的作用。



SA-Biotin 系统原理示意图

二、组分和保存条件

成分	容量（50 tests）	容量（100 tests）	储存
Buffer A（TritonX-100）	30 μL	60 μL	室温
Buffer C（20× SSC）	6 mL	12 mL	室温
Buffer E（杂交缓冲液）	8 mL	16 mL	室温
Buffer F（Tween 20）	50 μL	100 μL	室温
DEPC 水	6 mL	12 mL	-20℃
DAPI	15 μL	30 μL	-20℃
封闭液	100 μL	200 μL	4℃
SA-Cy3	50 μL	100 μL	4℃

三、 试剂配置

1. 0.1% Buffer A 配制：PBS 999 μL，Buffer A 1 μL，且每次新鲜配制；
2. Buffer C 母液为 20×，用一级纯水（建议 DEPC 水）稀释成 4× 、2× 使用；
3. 0.1% Buffer F 配制：4× Buffer C 999 μL，Buffer F 1 μL，且每次新鲜配制；
4. 封闭液为母液，100 μL 封闭液用 1× PBS（PBS 建议用 DEPC 水配制）定容至 5 mL 后可直接使用，4ºC 保存；
5. SA-Cy3 浓度为 1 μM，即用型试剂；
6. DAPI 工作液：DAPI 原液用 PBS 1000 倍稀释，需避光保存和使用。

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，如多聚甲醛等请您自备；
3. 实验过程中试剂建议用 DEPC 水配制；
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

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 μL 4%多聚甲醛，室温固定 15 min；
4. 吸弃 4%多聚甲醛，每孔加入 100 μL 0.1% Buffer A（现用现配）室温处理细胞 15 min（细胞通透）；
5. 吸弃 0.1% Buffer A，PBS 洗两次，每次 5 min；
6. 每孔加入 100 μL 1× 封闭液 ，37ºC 孵育 30 min；
7. 吸弃 1× 封闭液，每孔加入 100 μL 2× Buffer C，37ºC 培养箱放置 30 min；
8. Buffer E 提前在 73ºC 水浴锅孵育 30 min，至澄清透亮；
9. 探针稀释：可参看标签或报告单上所示参数：nmole/OD_{260}，例如：nmole/OD_{260}= 4.17，则在每 OD 探针干粉制品中加入 41.7 μL 灭菌 DEPC 水，混匀后即得浓度约为 100 μM 的储存液，建议进行分装后避光储存于-20ºC，避免多次冻融操作；
10. 配制探针工作液：将探针储存液稀释至 1 μM，放入 75ºC 水浴锅变性 10 min，然后与 SA-Cy3 按比例加入到 PBS，（以 10 μL 体系

为例，即 1 μL 1 μM biotin-probe + 1 μL 1 μM SA-Cy3 + 8 μL PBS），37ºC 孵育 30 min（可做预实验确定探针和 SA-Cy3 的比例，例如 1:1，2:1，4:1，8:1 等）；

11. 将上述 10 μL 探针工作液和 90 μL Buffer E 混匀；
12. 吸弃 2× Buffer C，每孔加入 100 μL 变性后的探针混合液，采取避光措施后置于 37ºC 培养箱中杂交过夜（12-16 h）；
13. 杂交次日，将样本从 37ºC 培养箱取出，吸弃探针混合液，每孔加入 100 μL 0.1% Buffer F 于 37ºC 洗涤 10 min；
14. 吸弃 0.1% Buffer F，每孔加入 100 μL 的 2× Buffer C，60ºC 洗涤 10 min，洗涤 3 次；
15. 吸弃 2× Buffer C，每孔加入 100 μL 的 2× Buffer C，37ºC 洗涤 10 min，洗涤 3 次（如果背景深时，建议适当提高洗涤温度及次数）；
16. 吸弃 2× Buffer C，每孔加入 100 μL 稀释后的 DAPI 工作液，避光染色 10-20 min（根据样本的种类，建议适当调整 DAPI 的浓度及染色时间）；
17. 吸弃 DAPI 工作液，PBS 洗涤 2 次，每次 5 min；
18. 滴加抗淬灭剂，盖上盖玻片，封片胶封片于荧光显微镜下观察（建议 2 天内完成拍摄）。

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 μL 0.1% Buffer A（现用现配）室温处理细胞 15 min（细胞通透）；
3. 吸弃 0.1% Buffer A，滴加 PBS 洗两次，每次 5 min；
4. 每张爬片滴加 100 μL 1× 封闭液 ，37ºC 孵育 30 min；
5. 吸弃封闭液，每张爬片滴加 100 μL 2× Buffer C，37ºC 培养箱放置 30 min；
6. Buffer E 提前在 73ºC 水浴锅孵育 30 min，至澄清透亮；
7. 探针稀释：可参看标签或报告单上所示参数：nmole/OD_{260}，例如：nmole/OD_{260}= 4.17，则在每 OD 探针干粉制品中加入 41.7 μL 灭菌 DEPC 水，混匀后即得浓度约为 100 μM 的储存液，建议进行分装后避光储存于-20ºC，避免多次冻融操作；
8. 配制探针工作液：将探针储存液稀释至 1 μM，放入 75ºC 水浴锅变性 10 min，然后与 SA-Cy3 按比例加入到 PBS，（以 10 μL 体系为例，即 1 μL 1 μM Biotin-probe + 1 μL 1 μM SA-Cy3 + 8 μL PBS），

37ºC 孵育 30 min（可做预实验确定探针和 SA-Cy3 的比例，例如 1:1，2:1，4:1，8:1 等）；

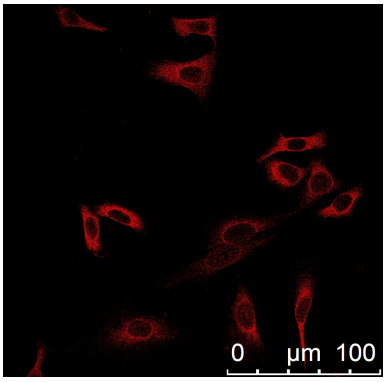
9. 将上述 10 μL 探针工作液和 90 μL Buffer E 混匀；
10. 准备湿盒，水平放置爬片，每张爬片滴加 100 μL 变性后的探针混合液，盖上盖玻片，用封片胶封片；
11. 置于原位杂交仪中，37ºC 孵育 12-16 h，注意保持湿度以防干片（若无杂交仪可滴加 100 μL 变性后的探针混合液，直接 37ºC 培养箱孵育 12-16 h）；
12. 杂交次日，将样本从 37ºC 培养箱取出，轻轻去掉盖玻片，吸弃探针混合液，每张爬片加入 100 μL 0.1% Buffer F，37ºC 洗涤 10 min；
13. 吸弃 0.1% Buffer F，每张爬片加入 100 μL 的 2× Buffer C ，60ºC 洗涤 10 min，洗涤 3 次；
14. 吸弃 2× Buffer C，每张爬片加入 100 μL 的 2× Buffer C，置于 37ºC 洗涤 10 min，洗涤 3 次（如果背景深时，建议适当提高洗涤温度及次数）；
15. 吸弃 2× Buffer C，每张爬片加入 100 μL 稀释后的 DAPI 工作液，避光染色 10-20 min（根据细胞的种类，建议适当调整 DAPI 的浓度及染色时间）；
16. 吸弃 DAPI 工作液，PBS 洗涤 2 次，每次 5 min；
17. 滴加抗淬灭剂，盖上盖玻片，封片胶封片于荧光显微镜下观察（建

议 2 天内完成拍摄）

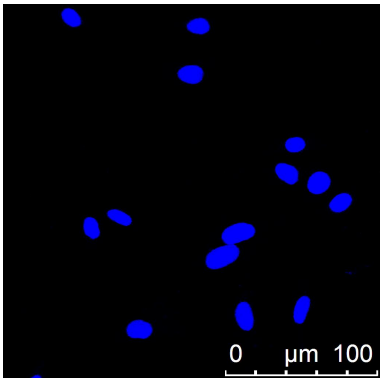
五、实验案例

5.1 贴壁细胞爬片

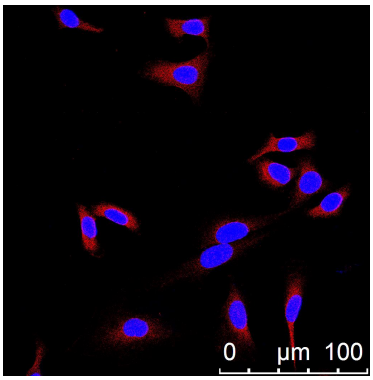
5.1.1 lncRNA



红光（Cy3 标记探针杂交）

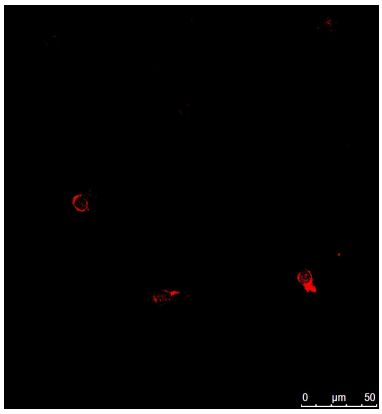


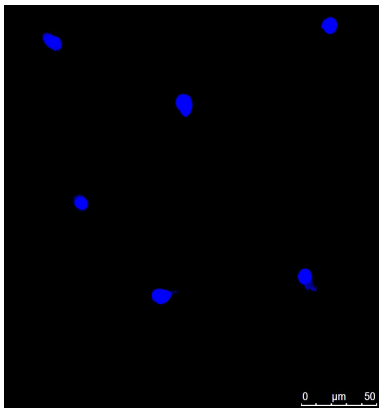
蓝光（DAPI 染核）

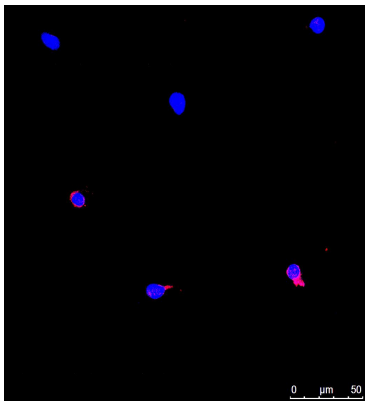


Merge

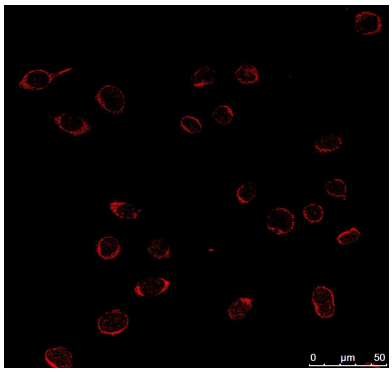
5.1.2 miRNA


红光（Cy3 标记探针杂交）

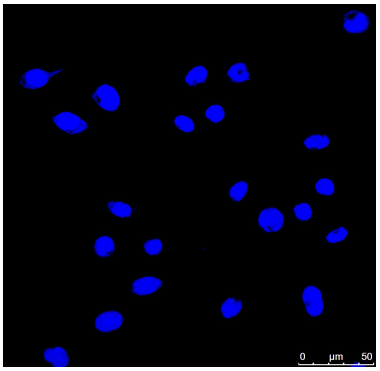

蓝光（DAPI 染核）


Merge

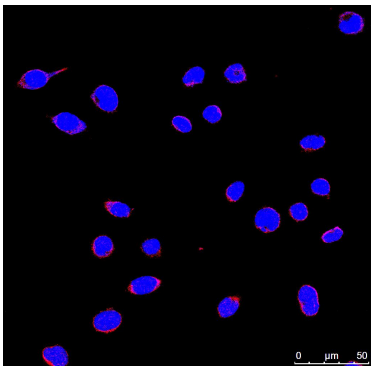
5.1.3 circRNA



红光（Cy3 标记探针杂交）

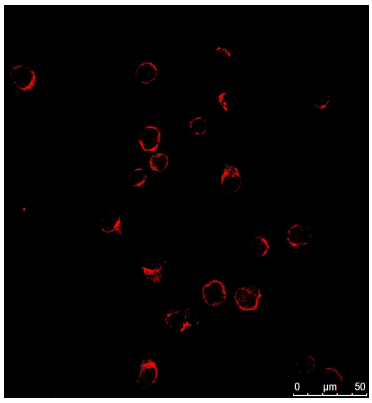


蓝光（DAPI 染核）

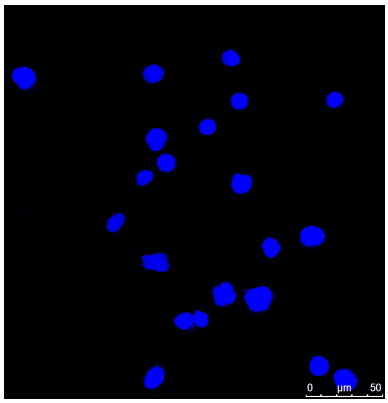


Merge

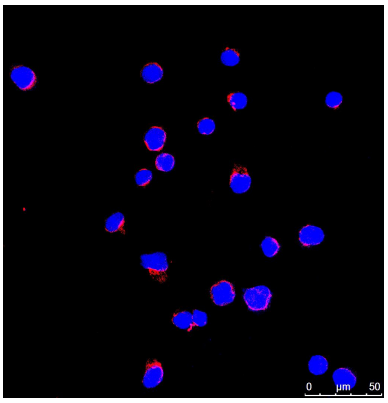
5.2 悬浮细胞烤片（lncRNA）



红光（Cy3 标记探针杂交）



蓝光（DAPI 染核）



Merge