



GenePharma

股票代码: 430601

吉玛基因

www.genepharma.com

RNA FISH 试剂盒 SA-Biotin 系统 (冰冻切片) 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>

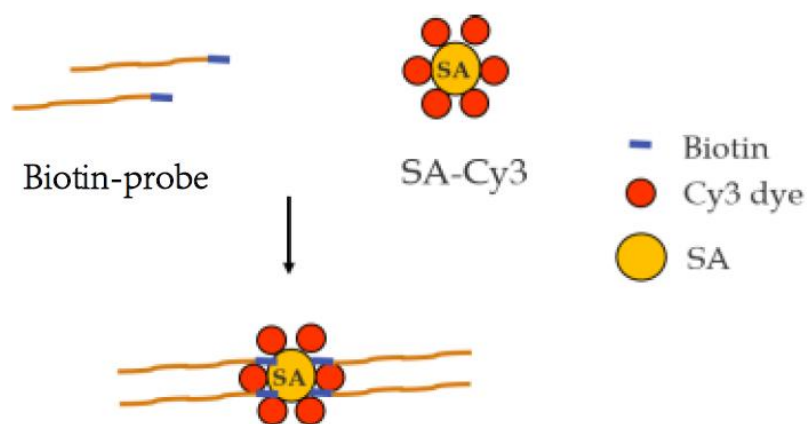


B039-V004-20230313

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 B (枸橼酸缓冲液)	10 mL	20 mL	室温
Buffer C (20× SSC)	10 mL	20 mL	室温
Buffer D (去离子甲酰胺)	14 mL	28 mL	室温
Buffer E (杂交缓冲液)	8 mL	16 mL	室温
蛋白酶 K	20 μL	40 μL	-20°C
DEPC 水	6 mL	12 mL	-20°C
DAPI	25 μL	50 μL	-20°C
封闭液	100 μL	200 μL	4°C
SA-Cy3	50 μL	100 μL	4°C

三、试剂配置

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 1000 倍稀释；
3. 变性液配制：2× Buffer C 100 μL，Buffer D 700 μL，一级纯水（建议 DEPC 水）定容至 1 mL，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，4℃ 保存；
5. SA-Cy3 浓度为 1 μM，即用型试剂；
6. 洗涤液配制：2× Buffer C 100 μL，Buffer D 500 μL，一级纯水（建议 DEPC 水）定容至 1 mL，每次新鲜配制；
7. DAPI 工作液：DAPI 原液用 PBS 1000 倍稀释,需避光保存和使用。

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请您自备；
- 4) 实验过程中试剂建议用 DEPC 水配制；
- 5) 探针配制方法及保存请参考探针使用报告；
- 6) 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 μ 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 μ L, 37°C 孵育 20 min (消化时间请根据不同样本进行调整);
- 3) 吸弃蛋白酶 K, 每张切片滴加 100 μ L 1 $\times$ 封闭液, 37°C 30 min;
- 4) 吸弃 1 $\times$ 封闭液, 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。

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. 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: 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) 配制探针工作液：将探针储存液稀释至 1 μ M，放入 75°C 水浴锅变性 10 min，然后与 SA-Cy3 按比例加入到 PBS，（以 10 μ L 体系为例，即 1 μ L 1 μ M Biotin-probe + 1 μ L 1 μ M SA-Cy3 + 8 μ L PBS），37°C 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）；
- 4) 将上述 10 μ L 探针工作液和 90 μ L Buffer E 混匀；
- 5) 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；
- 6) 置于原位杂交仪中，37°C 孵育 12-16 h，注意保持湿度以防干片（若无杂交仪可滴加 100 μ L 变性后的探针混合液，直接 37°C 培养箱孵育 12-16 h）。

5. 杂交后水洗

- 1) 43°C 预热洗涤液；
- 2) 轻轻去掉盖玻片，吸弃杂交溶液，每张切片滴加预热的洗涤液 100 μ L 洗切片 15 min；
- 3) 每张切片滴加 2 $\times$ Buffer C 100 μ L，60°C 洗 3 次，每次 10 min；
- 4) 吸弃 2 $\times$ Buffer C，每张切片滴加 100 μ L 的 2 $\times$ Buffer C，置于 37°C 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）。

6. 细胞核染色

- 1) 每张切片加 100 μL 稀释好的 DAPI 工作液，在室温下避光孵育 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）；
- 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

