



**GenePharma**

股票代码: 430601

**吉玛基因**  
**www.genepharma.com**

# **RNA FISH 试剂盒**

## **(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](mailto:support@genepharma.com)

苏州电话: 0512-86668828

E-mail: [szsupport@genepharma.com](mailto:szsupport@genepharma.com)

<http://www.genepharma.com>



B036-V002-20191025



## 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。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、定量或相对定位分析。

## 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)	8 ml	室温
蛋白酶 K	20 $\mu$ l	-20°C
DEPC 水	6 ml	-20°C
DAPI	25 $\mu$ l	-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 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。

### 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. 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。



GenePharma

股票代码: 430601

吉玛基因  
www.genepharma.com

## 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. 蛋白酶处理:

- 1) 蛋白酶 K 稀释溶液预热至 37°C;
- 2) 每张切片滴加蛋白酶 K 稀释溶液 100  $\mu$ l, 37°C 孵育 20min (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 2 $\times$ Buffer C 100  $\mu$ l 在室温下漂洗切片 3 次, 每次 1min;
- 4) 梯度酒精 70%、80%、90%、100% 脱水, 每次 2 min, 空气中干燥。

### 3. 变性:

- 1) 78 °C 预热变性液;
- 2) 每张切片滴加预热后的变性液 100  $\mu$ l, 孵育 8 min;
- 3) 梯度酒精 70%、80%、90%、100% 脱水, 每次 2 min, 空气中干燥。

### 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: 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  $\mu$ 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: 以 100  $\mu$ l 探针混合液为例, 即探针 X  $\mu$ l (可先做预实验确定所需的探针浓度: 建议您使用时设置不同工作浓度梯度进行预实验, 例: 0.5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 2  $\mu$ M, 4  $\mu$ M, 8  $\mu$ M) 加入 Buffer E, 总体系 100  $\mu$ l, 73 °C 变性 5 min。
- 4) 准备湿盒, 水平放置切片, 每张切片滴加 10  $\mu$ l 变性后的探针混合液, 盖上盖玻片, 用封片胶封片。
- 5) 置于原位杂交仪中, 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



GenePharma

股票代码: 430601

吉玛基因  
www.genepharma.com

合液, 直接 37 °C 培养箱孵育 12-16 h)。

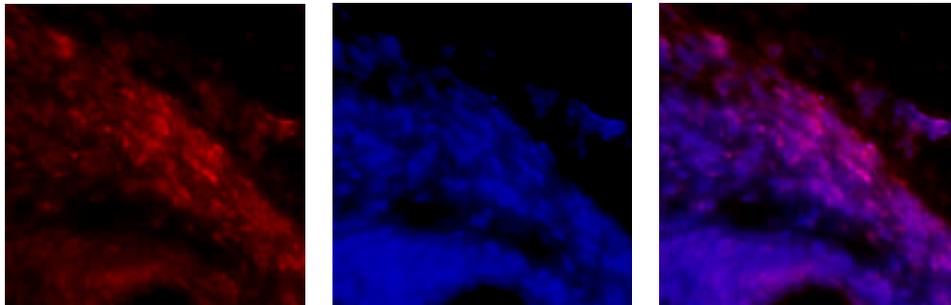
**5. 杂交后水洗:**

- 1) 43 °C 预热杂交后水洗溶液;
- 2) 轻轻去掉盖玻片, 吸弃探针混合液, 每张切片滴加预热的杂交后水洗溶液 100  $\mu$ l 43 °C 洗切片 15 min;
- 3) 每张切片滴加 2 $\times$ Buffer C (预热至 37 °C) 100  $\mu$ l 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. 细胞核染色:**

- 1) 每张切片加 100  $\mu$ l 稀释好的 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) 滴加甘油或抗淬灭剂, 盖上盖玻片, 封片胶封片, 于荧光显微镜下观察。

**五、 实验案例**



红光 (CY3 标记探针杂交)

蓝光 (DAPI 染核)

MERGE