



**GenePharma**

股票代码: 430601

**吉玛基因**  
**www.genepharma.com**

# **RNA FISH 试剂盒**

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

苏州电话: 0512-86668828

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

<http://www.genepharma.com>



B023-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。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 A (TritonX-100)	30 $\mu$ l	室温
Buffer C (20 $\times$ SSC)	6 ml	室温
Buffer E (杂交缓冲液)	8 ml	室温
Buffer F (Tween 20)	50 $\mu$ l	室温
DEPC 水	6 ml	-20 $^{\circ}$ C
DAPI	15 $\mu$ l	-20 $^{\circ}$ C

## 三、 试剂配制

- 0.1% Buffer A 配制: PBS 999  $\mu$ l, Buffer A 1 $\mu$ l, 且每次新鲜配制。
- Buffer C 母液为 20 $\times$ , 用一级纯水稀释成 4 $\times$ 、2 $\times$ 或 1 $\times$ 使用。
- 0.1% Buffer F 配制: 4 $\times$ Buffer C 999  $\mu$ l, Buffer F 1  $\mu$ l, 且每次新鲜配制。
- DAPI 工作液: 用 PBS 按照 1:1000 稀释, 需避光保存和使用。

### 注意:

- 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。
- 实验过程中常用试剂, 如多聚甲醛等请您自备。
- 探针配制方法及保存请参考探针使用报告。
- 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)

- 按照  $1 \times 10^4$  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。



GenePharma

股票代码: 430601

吉玛基因  
www.genepharma.com

2. 吸弃培养基, PBS 洗两次, 每次 5min。
3. 吸弃 PBS, 每孔加入 100  $\mu$ l 4%多聚甲醛, 室温固定 15min。
4. 吸弃 4%多聚甲醛, 每孔加入 100  $\mu$ l 0.1% Buffer A(现用现配)室温处理细胞 15min。
5. 吸弃 0.1% Buffer A, PBS 洗两次, 每次 5 min。
6. 吸弃 PBS, 每孔加入 100  $\mu$ l 2 $\times$ Buffer C, 37 $^{\circ}$ C 培养箱放置 30 min。
7. Buffer E 提前在 73 $^{\circ}$ C 水浴锅孵育 30 min, 至澄清透亮。
8. 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 $^{\circ}$ C, 避免多次冻融操作。
9. 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, 总体积 100  $\mu$ l, 73  $^{\circ}$ C 变性 5 min。
10. 吸弃 2 $\times$ Buffer C, 每孔加入 100 $\mu$ l 变性后的探针混合液, 采取避光措施后置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中杂交过夜。
11. 杂交次日, 将样本从 37 $^{\circ}$ C 培养箱取出, 吸弃探针混合液, 每孔加入 100  $\mu$ l 42 $^{\circ}$ C 预热的 0.1% Buffer F 洗涤 5 min。
12. 吸弃 0.1% Buffer F, 每孔加入 100  $\mu$ l 42 $^{\circ}$ C 预热的 2 $\times$ Buffer C 洗涤 5 min。
13. 吸弃 2 $\times$ Buffer C, 每孔加入 100  $\mu$ l 42 $^{\circ}$ C 预热的 1 $\times$ Buffer C 洗涤 5 min, 吸弃洗涤液。
14. 每孔加入 100  $\mu$ l 稀释后的 DAPI 工作液, 避光染色 20 min。
15. 吸弃 DAPI 工作液, PBS 洗两次, 每次 5min。
16. 滴加甘油或抗淬灭剂于干净的载玻片, 将细胞爬片细胞面朝下盖在载玻片上, 于荧光显微镜下观察 (封片胶封片可延长爬片保存时间, 1 周内完成拍摄)。

#### 4.2 悬浮细胞

1. 将悬浮细胞固定在玻片上:
  - a) 方法一: 用甩片机将 4%多聚甲醛固定的悬浮细胞贴在玻片 (多聚赖氨酸处理) 上;



GenePharma

股票代码: 430601

吉玛基因  
www.genepharma.com

- 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  $\mu$ l 0.1% Buffer A (现用现配) 室温处理细胞 15min。
3. 吸弃 0.1% Buffer A, 滴加 PBS 洗两次, 每次 5 min。
4. 吸弃 PBS, 滴加 100  $\mu$ l 2 $\times$ Buffer C, 37 $^{\circ}$ C 培养箱放置 30 min。
5. Buffer E 提前在 73 $^{\circ}$ C 水浴锅孵育 30 min, 至澄清透亮。
6. 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 $^{\circ}$ C, 避免多次冻融操作。
7. 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  $^{\circ}$ C 变性 5 min。
8. 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。
9. 置于原位杂交仪中, 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)。
10. 杂交次日, 将样本从 37 $^{\circ}$ C 培养箱取出, 轻轻去掉盖玻片, 吸弃探针混合液, 每张玻片滴加 100  $\mu$ l 42 $^{\circ}$ C 预热的 0.1% Buffer F 洗涤 5 min。
11. 吸弃 0.1% Buffer F, 每张玻片滴加 100  $\mu$ l 42 $^{\circ}$ C 预热的 2 $\times$ Buffer C 洗涤 5 min。
12. 吸弃 2 $\times$ Buffer C, 每张玻片滴加 100  $\mu$ l 42 $^{\circ}$ C 预热的 1 $\times$ Buffer C 洗涤 5 min, 吸弃洗涤液, 于室温干燥。
13. 每张玻片滴加 100  $\mu$ l 稀释后的 DAPI 工作液, 避光染色 20 min。
14. 吸弃 DAPI 工作液, 每张玻片滴加 100  $\mu$ l PBS 洗 2 次, 每次 2 min;
15. 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。



GenePharma

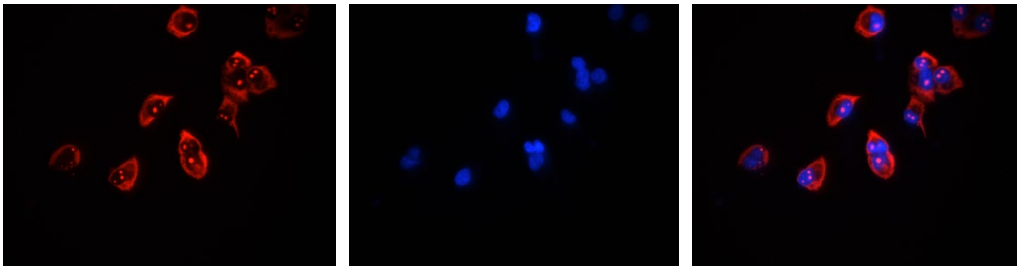
股票代码: 430601

吉玛基因  
www.genepharma.com

## 四、 实验案例

### 4.1 贴壁细胞爬片

#### 4.1.1 Lnc RNA

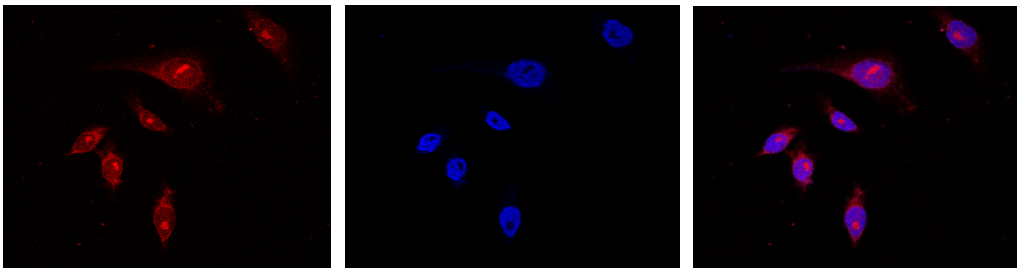


红光 (CY3 标记探针杂交)

蓝光 (DAPI 染核)

MERGE

#### 4.1.2 miRNA

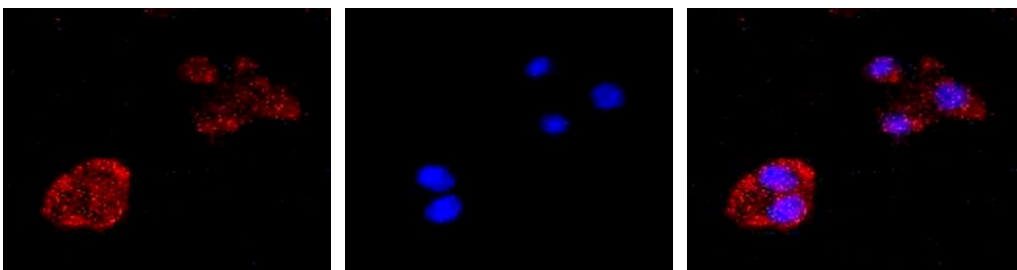


红光 (CY3 标记探针杂交)

蓝光 (DAPI 染核)

MERGE

#### 4.1.3 mRNA



红光 (CY3 标记探针杂交)

蓝光 (DAPI 染核)

MERGE

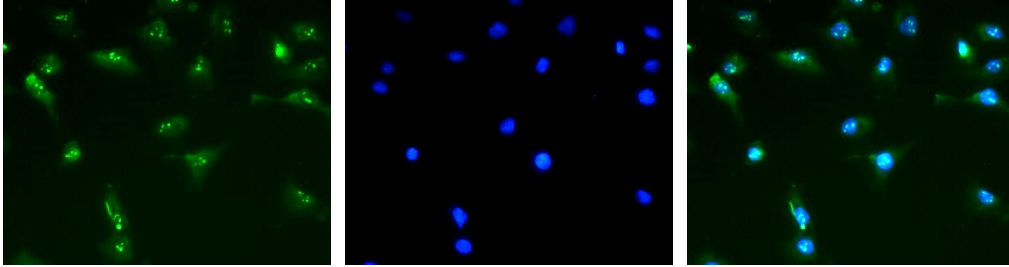


GenePharma

股票代码: 430601

吉玛基因  
www.genepharma.com

#### 4.1.4 circRNA

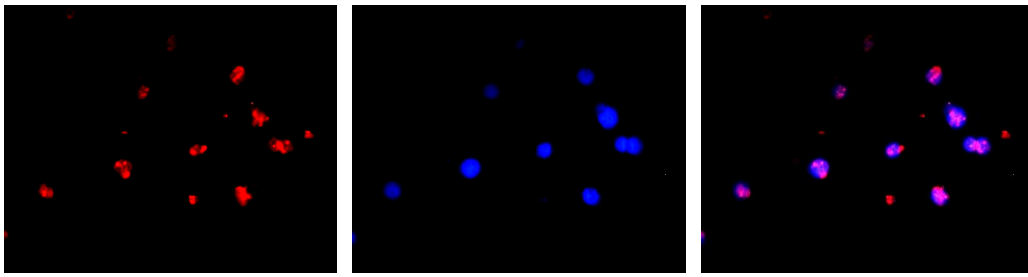


绿光 (FAM 标记探针杂交)

蓝光 (DAPI 染核)

MERGE

#### 4.2 悬浮细胞烤片 (Lnc RNA)



红光 (CY3 标记探针杂交)

蓝光 (DAPI 染核)

MERGE