



GenePharma

股票代码: 430601

吉玛基因

www.genepharma.com

RNA FISH 试剂盒 SA-Biotin 系统 (石蜡切片) 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>



B040-V003-20201215



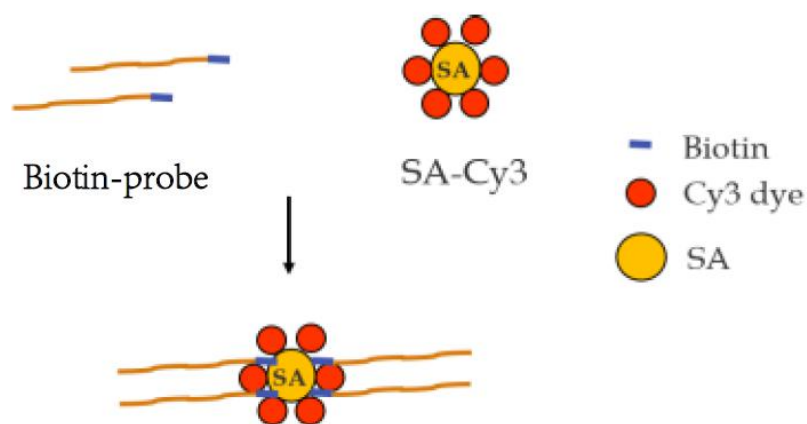
GenePharma
股票代码: 430601

吉玛基因
www.genepharma.com

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



GenePharma
股票代码: 430601

吉玛基因
www.genepharma.com

二、组分和保存条件

成分	容量 (50 tests)	容量 (100 tests)	储存
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 \times ，用一级纯水（建议 DEPC 水）稀释成 4 \times 、2 \times 使用；
2. 蛋白酶 K 工作液：蛋白酶 K 用 2 \times Buffer C 1000 倍稀释；
3. 变性液配制：2 \times Buffer C 400 μ L，Buffer D 2800 μ L，一级纯水（建议 DEPC 水）定容至 4 mL，每次新鲜配制；
4. 封闭液为母液，100 μ L 封闭液用 1 \times PBS（PBS 建议用 DEPC 水配制）定容至 5 mL 后可直接使用，4 $^{\circ}$ C 保存；
5. SA-Cy3 浓度为 1 μ M，即用型试剂；
6. 洗涤液配制：2 \times Buffer C 400 μ L，Buffer D 2000 μ L，一级纯水（建议 DEPC 水）定容至 4 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，如二甲苯请您自备；
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. 脱蜡

- 1) 石蜡切片在 60°C 烤箱中预热 30 min (预热时间建议根据同一样本进行适当增减) 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 (消化时间建议根据同一样本进行适当增减);
- 3) 吸弃蛋白酶 K, 每张切片滴加 100 μ L 1 \times 封闭液, 37°C 孵育 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 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 -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 μM, 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 μL 体系为例, 即 1 μL 1 μM Biotin-probe + 1 μL 1 μM SA-Cy3 + 8 μL 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 μL 探针工作液和 90 μL Buffer E 混匀;
- 5) 准备湿盒, 水平放置切片, 每张切片滴加 100 μL 变性后的探针混合液, 盖上盖玻片, 用封片胶封片;
- 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 μL 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 μL 洗切片 15 min;

- 3) 每张切片滴加 2× Buffer C 100 μ L , 60°C 洗 3 次, 每次 10 min;
- 4) 吸弃 2× Buffer C, 每孔加入 100 μ L 的 2× 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 μ L 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 (建议 2 天内完成拍摄)。

五、实验案例

