



GenePharma

股票代码: 430601

# 吉玛基因

[www.genepharma.com](http://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-V004-20201215



## 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: 用已知的荧光染料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)	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



GenePharma  
股票代码: 430601

吉玛基因  
www.genepharma.com

### 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 用 2× Buffer C 1000 倍稀释；
3. 变性液配制：2× Buffer C 400 μL， Buffer D 2800 μL，一级纯水（建议 DEPC 水）定容至 4 mL，每次新鲜配制；
4. 洗涤液配制：2× Buffer C 400 μL， Buffer D 2000 μL，一级纯水（建议 DEPC 水）定容至 4 mL，每次新鲜配制；
5. 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. 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

### 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 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  $\mu$ L, 37°C 孵育 20 min (消化时间请根据不同样本进行调整);
- 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 1 min;
- 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 (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/OD<sub>260</sub>, 例如:



GenePharma  
股票代码: 430601

吉玛基因  
www.genepharma.com

$\text{nmole}/\text{OD}_{260} = 4.17$ , 则在每 OD 探针干粉制品中加入  $41.7 \mu\text{L}$  灭菌 DEPC 水, 混匀后即得浓度约为  $100 \mu\text{M}$  的储存液, 建议进行分装后避光储存于  $-20^\circ\text{C}$ , 避免多次冻融操作;

- 3) 配制探针混合液: 以  $100 \mu\text{L}$  探针混合液为例, 即探针  $X \mu\text{L}$  (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:  $0.5 \mu\text{M}$ ,  $1 \mu\text{M}$ ,  $2 \mu\text{M}$ ,  $4 \mu\text{M}$ ,  $8 \mu\text{M}$ ) 加入 Buffer E, 总体积  $100 \mu\text{L}$ ,  $73^\circ\text{C}$  变性  $5 \text{ min}$ ;
- 4) 准备湿盒, 水平放置切片, 每张切片滴加  $100 \mu\text{L}$  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,  $37^\circ\text{C}$  孵育  $12-16 \text{ h}$ , 注意保持湿度以防干片 (若无杂交仪可滴加  $100 \mu\text{L}$  变性后的探针混合液, 直接  $37^\circ\text{C}$  培养箱孵育  $12-16 \text{ h}$ )。

## 5. 杂交后水洗

- 1)  $43^\circ\text{C}$  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  $100 \mu\text{L}$ ,  $43^\circ\text{C}$  洗切片  $15 \text{ min}$ ;
- 3) 每张切片滴加  $2 \times$  Buffer C (预热至  $37^\circ\text{C}$ )  $100 \mu\text{L}$  洗 2 次, 每次  $10 \text{ min}$ ;
- 4) PBS 洗切片 1 次,  $10 \text{ min}$  (建议在染缸中进行)。



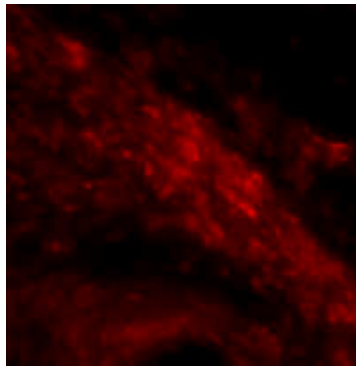
GenePharma  
股票代码: 430601

吉玛基因  
www.genepharma.com

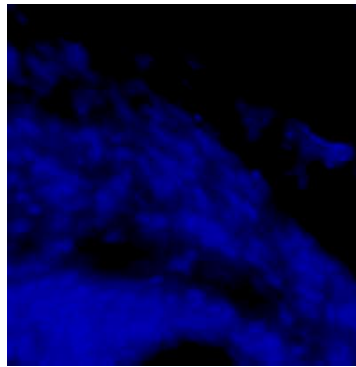
## 6. 细胞核染色

- 1) 每张切片加 100  $\mu\text{L}$  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）。

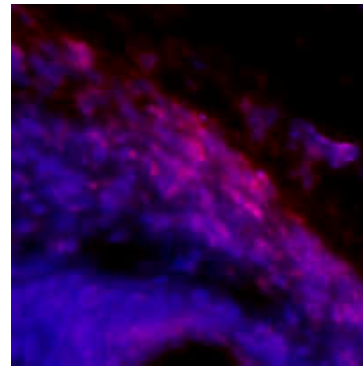
## 五、 实验案例



红光 (Cy3 标记探针杂交)



蓝光 (DAPI 染核)



Merge