



GenePharma

股票代码: 430601

吉玛基因
www.genepharma.com

RNA 荧光原位杂交 (FISH) 试剂 盒 (冰冻切片) 说明书

如有疑问欢迎垂询

version3.1

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>





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	10 ml	室温
Buffer C	10 ml	室温
Buffer D	14 ml	室温
Buffer E	8 ml	室温
蛋白酶 K	20 μ l	-20 $^{\circ}$ C
DEPC 水	6 ml	-20 $^{\circ}$ C
DAPI	25 μ l	-20 $^{\circ}$ C

注意:

1. Buffer C 母液为 20 \times , 用一级纯水 (建议 DEPC 水) 稀释成 2 \times Buffer C 使用。
2. Buffer D 在通风橱使用。
3. 蛋白酶 K 用 2 \times Buffer C 按照 1:1000 稀释。
4. 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。
5. 杂交后水洗液配制: 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。
6. 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。
7. DAPI 工作液: 用 PBS 按照 1:1000 稀释, 需避光保存和使用。
8. 实验过程中常用试剂请您自备。
9. 探针配制方法及保存请参考探针使用报告。
10. 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。

三、 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 15min;
- 2) 吸弃 Buffer B, PBS 洗切片两次, 每次 5min (建议在染缸中进行);

2. 蛋白酶处理:



GenePharma

吉玛基因
www.genepharma.com

股票代码: 430601

- 1) 蛋白酶 K 稀释溶液预热至 37 ℃;
- 2) 每张切片滴加蛋白酶 K 稀释溶液 100μl, 37 ℃ 孵育 20min;
- 3) 每张切片滴加 2×Buffer C 100μl 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 2min, 空气中干燥。

3. 变性:

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

4. 杂交:

- 1) 探针稀释:

可参看探针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 41.7μl 灭菌 DEPC 水, 混匀后即得浓度约为 100μM 的储存液。

- 2) 配制探针混合液:

例: 70μl Buffer E, 2μl 探针, 28μl DEPC 水, 终体积为 100μl, (可先做预实验确定所需的探针浓度, 即探针 5 μl~0.6 μl, 70μl Buffer E, 加 DEPC 水补足至 100μl。)

配制好的探针混合液 73 ℃ 变性 5min;

- 3) 准备湿盒, 用免疫组化笔沿组织周围划圈, 水平放置切片;
- 4) 滴加 100μl 探针混合液在切片组织上;
- 5) 盖上湿盒盖, 37 ℃ 孵育 12-16h。

5. 杂交后水洗:

- 1) 43 ℃ 预热杂交后水洗溶液;
- 2) 吸弃杂交溶液, 每张切片滴加预热的杂交后水洗溶液 100μl 43 ℃ 洗切片 15min;
- 3) 每张切片滴加 2×Buffer C (预热至 37 ℃) 100μl 洗 2 次, 每次 10min;
- 4) PBS 洗切片 1 次, 10min (建议在染缸中进行)。

6. 细胞核染色:

- 1) 每张切片加 100μl 稀释好的 DAPI 工作液, 在室温下避光孵育 20min;



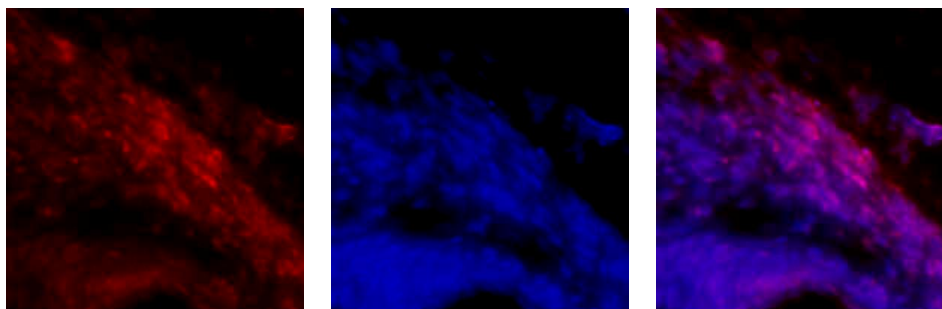
GenePharma

股票代码: 430601

吉玛基因
www.genepharma.com

- 2) 吸弃 DAPI 工作液, PBS 洗切片 2 次, 每次 2min (建议在染缸中进行);
- 3) 滴加甘油或抗淬灭剂, 盖上盖玻片, 于荧光显微镜下观察。

四、 实验案例



红光 (CY3 标记探针杂交)

蓝光 (DAPI 染核)

MERGE