



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

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。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	30 $\mu$ l	室温
Buffer C	6 ml	室温
Buffer E	8 ml	室温
Buffer F	50 $\mu$ l	室温
DEPC 水	6 ml	-20 $^{\circ}$ C
DAPI	15 $\mu$ l	-20 $^{\circ}$ C

### 注意:

1. 0.1% Buffer A 配制: PBS 999 $\mu$ l, Buffer A 1 $\mu$ l, 且每次新鲜配制。
2. Buffer C 母液为 20 $\times$ , 用一级纯水稀释成 4 $\times$ Buffer C、2 $\times$ Buffer C 或 1 $\times$ Buffer C 使用。
3. 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。
4. 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。
5. DAPI 工作液: 用 PBS 按照 1:1000 稀释, 需避光保存和使用。
6. 实验过程中常用试剂, 如多聚甲醛等请您自备。
7. 探针配制方法及保存请参考探针使用报告。
8. 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

### 3.1 贴壁细胞 (以 48 孔板为例)

1. 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), 混匀后于 37 $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养过夜。
2. 吸弃孔板中的培养基, 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 5min。
6. 吸弃 PBS, 每孔加入 100 $\mu$ l 2 $\times$ Buffer C, 37 $^{\circ}$ C 培养箱放置 30min。



GenePharma

吉玛基因  
www.genepharma.com

股票代码: 430601

7. 吸弃 2×Buffer C, 每孔加入 100μl 70%乙醇, 室温放置 3min。
8. 吸弃 70%乙醇, 每孔加入 100μl 85%乙醇, 室温放置 3min。
9. 吸弃 85%乙醇, 每孔加入 100μl 无水乙醇, 室温放置 3min。
10. 吸弃无水乙醇, 室温干燥。
11. Buffer E 提前在 37℃ 水浴锅孵育 2h。
12. 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。
13. 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。)
14. 每孔加入上述 100μl 探针混合液, 73℃ 变性 5min, 37℃ 培养箱杂交孵育过夜 12~16h。
15. 杂交次日, 将样本从 37℃ 培养箱取出, 吸弃探针混合液, 每孔加入 100μl 0.1% Buffer F 洗涤 5min。
16. 吸弃 0.1% Buffer F, 每孔加入 100μl 的 2×Buffer C 洗涤 5min。
17. 吸弃 2×Buffer C, 每孔加入 100μl 的 1×Buffer C 洗涤 5min, 吸弃洗涤液。
18. 吸弃 1×Buffer C, 每孔加入 100μl 稀释后的 DAPI 工作液, 避光染色 20min, 吸弃, 加入 100μl PBS, 尽快于荧光显微镜下观察。

### 3.2 悬浮细胞

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

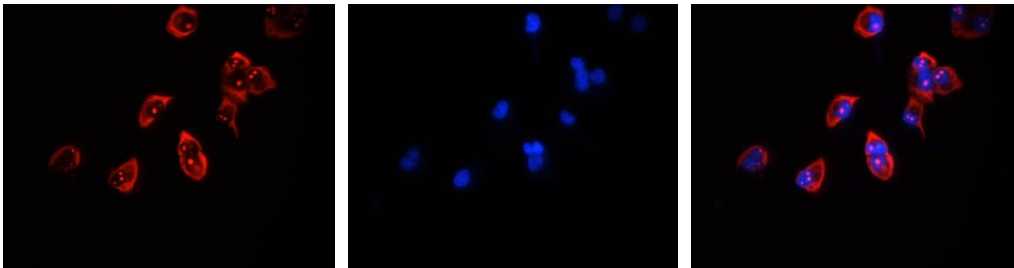
2. 将烤干的细胞涂片置于 10cm dish 中, 滴加 100 $\mu$ l 0.1% Buffer A 消化 15min。
3. 吸弃 0.1% Buffer A, 滴加 PBS 洗两次, 每次 5min。
4. 吸弃 PBS, 滴加 100 $\mu$ l 2 $\times$ Buffer C, 37  $^{\circ}$ C 培养箱放置 30min。
5. 吸弃 2 $\times$ Buffer C, 滴加 100 $\mu$ l 70%乙醇, 室温放置 3min。
6. 吸弃 70%乙醇, 滴加 100 $\mu$ l 85%乙醇, 室温放置 3min。
7. 吸弃 85%乙醇, 滴加 100 $\mu$ l 无水乙醇, 室温放置 3min。
8. 吸弃无水乙醇, 室温干燥。
9. Buffer E 提前在 37  $^{\circ}$ C 水浴锅孵育 2h。
10. 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 41.7 $\mu$ l 灭菌 DEPC 水, 混匀后即得浓度约为 100 $\mu$ M 的储存液。
11. 配制探针混合液:  
例: 70 $\mu$ l Buffer E, 2 $\mu$ l 探针, 28 $\mu$ l DEPC 水, 终体积为 100 $\mu$ l; (可先做预实验确定所需的探针浓度, 即探针 5  $\mu$ l $\sim$ 0.6  $\mu$ l, 70 $\mu$ l Buffer E, 加 DEPC 水补足至 100 $\mu$ l。)
12. 将玻片水平放置于湿盒中, 每张玻片滴加 100 $\mu$ l 探针混合液, 73  $^{\circ}$ C 变性 5min, 37  $^{\circ}$ C 培养箱杂交孵育过夜 12 $\sim$ 16h。
13. 杂交次日, 将样本从 37  $^{\circ}$ C 培养箱取出, 吸弃探针混合液, 每张玻片滴加 100 $\mu$ l 的 0.1% Buffer F 洗涤 5min。
14. 吸弃 0.1% Buffer F, 每张玻片滴加 100 $\mu$ l 的 2 $\times$ Buffer C 洗涤 5min。
15. 吸弃 2 $\times$ Buffer C, 每张玻片滴加 100 $\mu$ l 的 1 $\times$ Buffer C 洗涤 5min, 吸弃洗涤液, 于室温干燥。
16. 每张玻片滴加 100 $\mu$ l 稀释后的 DAPI 工作液, 避光染色 20min, 吸弃, 每张玻片滴加 100 $\mu$ l PBS 洗 2 次, 每次 2min;
17. 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

### 4.1 贴壁细胞爬片

#### 4.1.1 lncRNA

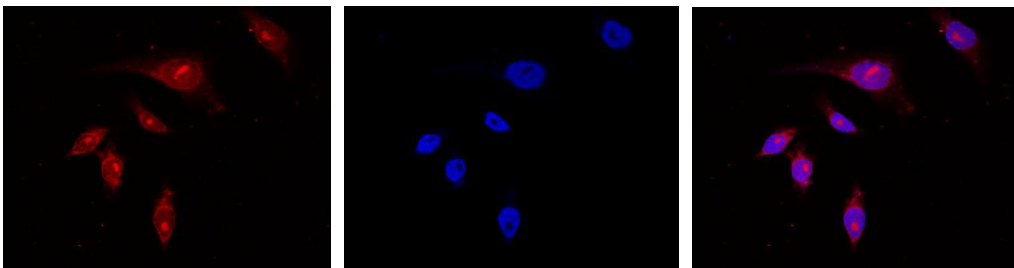


红光 (CY3 标记探针杂交)

蓝光 (DAPI 染核)

MERGE

#### 4.1.2 miRNA

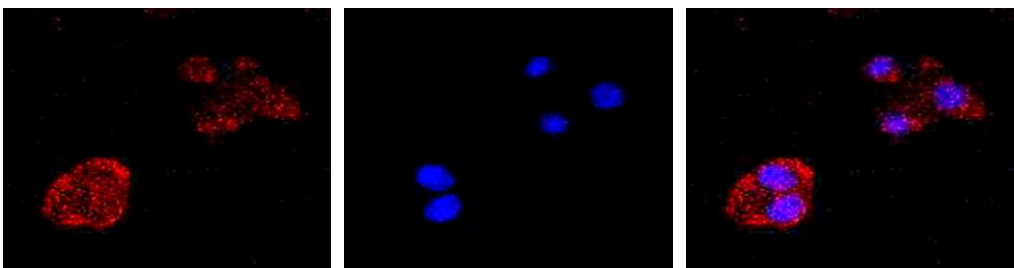


红光 (CY3 标记探针杂交)

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



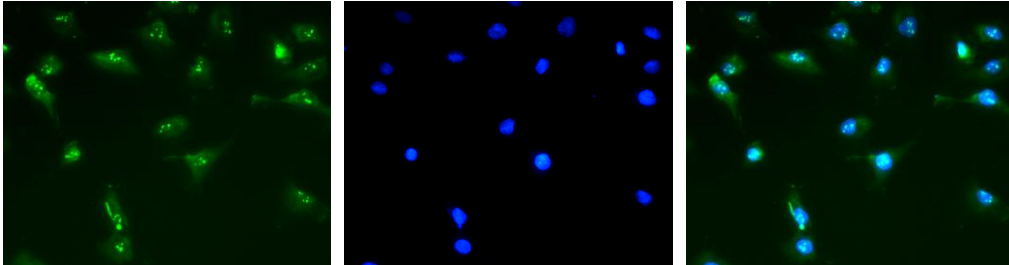
GenePharma

股票代码: 430601

吉玛基因

www.genepharma.com

#### 4.1.4 circRNA

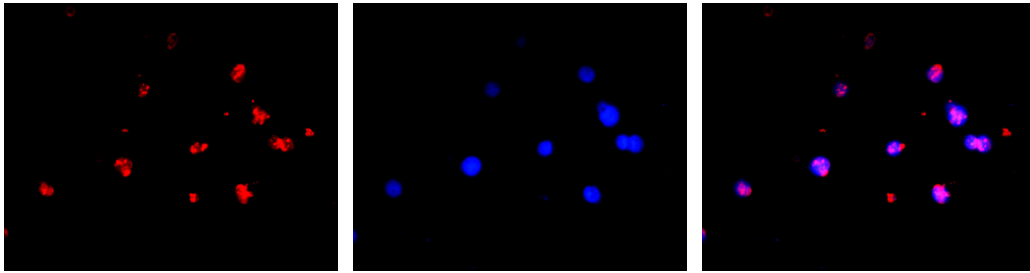


绿光 (FAM 标记探针杂交)

蓝光 (DAPI 染核)

MERGE

#### 4.2 悬浮细胞烤片 (lncRNA)



红光 (CY3 标记探针杂交)

蓝光 (DAPI 染核)

MERGE