



**GenePharma**  
股票代码: 430601

**吉玛基因**  
[www.genepharma.com](http://www.genepharma.com)

---

# RNA FISH 试剂盒 (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](mailto:support@genepharma.com)

苏州电话: 0512-86668828

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

<http://www.genepharma.com>



B037-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。它的基本原理是: 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 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，如二甲苯请您自备；
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。



GenePharma  
股票代码: 430601

吉玛基因  
www.genepharma.com

## 四、实验方法

### 1. 脱蜡

- 1) 石蜡切片在 60°C 烤箱中预热 30 min (预热时间建议根据不同样本进行适当增减) 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  $\mu$ L, 37°C 孵育 20 min (消化时间建议根据不同样本进行适当增减);
- 3) 每张切片滴加 100  $\mu$ L 2 $\times$  Buffer C 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 (建议在染缸中进行)。

### 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, 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/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 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) 配制探针混合液：以 100 μL 探针混合液为例，即探针 X μL（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 μM，1 μM，2 μM，4 μM，8 μM）加入 Buffer E，总体系 100 μL，73°C 变性 5 min；
- 4) 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；
- 5) 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；



GenePharma  
股票代码: 430601

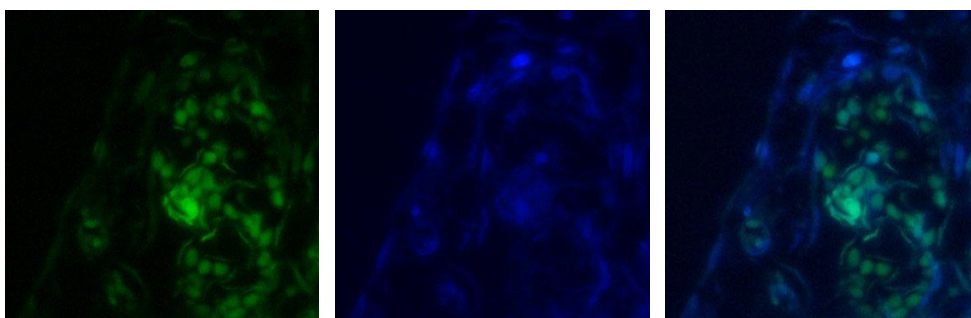
吉玛基因  
www.genepharma.com

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

## 6. 细胞核染色

- 1) 每张切片加  $100\ \mu\text{L}$  稀释后的 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



绿光 (FAM 标记探针杂交)

蓝光 (DAPI 染核)

Merge