



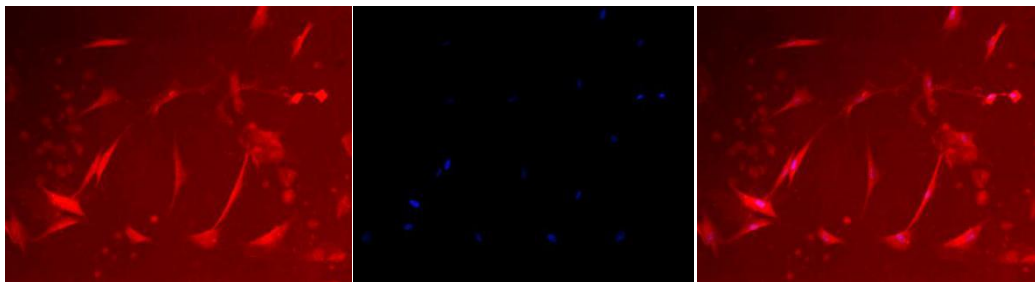
GenePharma

股票代码：430601

吉玛基因
www.genepharma.com

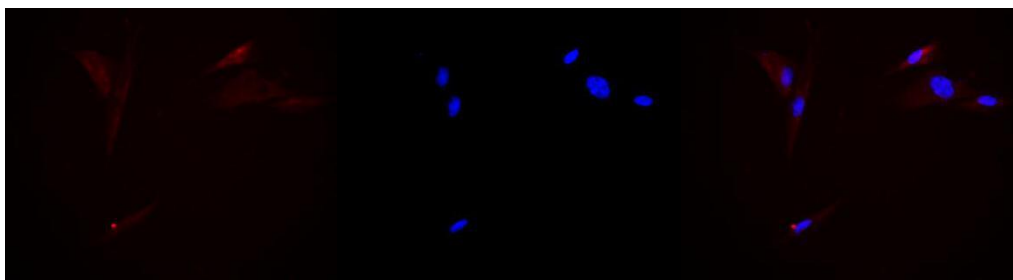
常规 RNA FISH 实验常见问题及解决方案

问题 1：非特异背景过深



- 1) 探针浓度太大，可设置 0.2 μM ，0.5 μM ，1 μM ，2 μM ，4 μM 梯度探针工作浓度进行预实验，选择合适的探针浓度进行正式实验。
- 2) 杂交时间过长，杂交时间缩短 4~6h。杂交温度提高至 42~47°C，减少非特异基因结合。
- 3) 可在探针杂交前增加预杂交步骤，优化杂交温度，时间等条件。
- 4) 杂交后洗涤不充分，可适当提高洗涤温度，延长洗涤时间，增加洗涤次数。

问题 2：目的探针没有荧光信号或信号很弱



- 1) 样本是石蜡切片，则有可能脱蜡不完全
 - a) 烤片时观察切片上的石蜡融化成水滴状后（具体时间不定，根据石蜡的厚度有所差别），立即放入准备好的二甲苯中（避免烤好的切片在室温停留太长时间使石蜡再次凝固）。
 - b) 二甲苯脱蜡次数可适当增加，建议每次使用新的二甲苯。
- 2) 样本是细胞爬片，则有可能通透不彻底
 - a) 0.1% Buffer A 通透时间延长至 20~30min。



GenePharma

股票代码: 430601

吉玛基因
www.genepharma.com

- b) 0.1% Buffer A 浓度提高至 0.2%~0.5%。
- 3) 基因表达丰度低
 - a) 提高探针工作浓度至 2 μ M, 4 μ M, 8 μ M 进行实验, 若探针工作浓度 4~8 μ M 仍信号弱, 则考虑以下建议。
 - b) 针对同一 RNA 设计多条探针混合杂交。
 - c) 探针建议进行特殊修饰。
 - d) 探针信号放大, 如 SA 信号放大。
- 4) 探针或样本 RNA 降解
 - a) 探针溶解后低温 (-20 $^{\circ}$ C) 避光保存, 避免反复冻融。
 - b) 避免核酸酶污染。

问题 3: 阴性对照和阳性对照结果不符合预期

- 1) 阴性对照有荧光信号
 - a) 探针浓度太大, 杂交时间过长。可减小探针浓度, 适当缩短杂交时间。
 - b) 目的细胞和另外一种细胞, 如 293T 细胞同时进行实验, 若 293T 细胞上实验结果符合预期, 则考虑反应操作条件与目的细胞基因表达丰度信息, 必要情况下可更换备用 NC 序列。
- 2) 阳性对照荧光信号弱或定位不准
 - a) 样本前期处理。例石蜡切片脱蜡不完全, 细胞爬片通透不彻底。
 - b) 阳性对照基因表达丰度相对较高, 探针浓度过大会导致定位出现偏差。相较于目的探针使用浓度可适当减小。

目的细胞和另外一种细胞, 如 293T 细胞同时进行实验, 若 293T 细胞上实验结果符合预期, 则考虑反应操作条件与目的细胞基因表达丰度信息, 必要情况下可更换备用阳性对照序列



A005-V001B-20210310