



GenePharma

股票代码：430601

吉玛基因
www.genepharma.com

RNA FISH(SA-Biotin) 实验常见问题及解决方案

问题一：18S 核内信号，NC 有非特异性信号（背景高）的问题？

1. **杂交**：适当升高杂交温度，比如 40-45°C，提高温度或缩短杂交时间可以提高杂交特异性，减少非特异性结合，从而降低背景。
2. **洗涤**：洗涤液提前预热至洗涤温度，提高洗涤频次和温度，按照梯度条件洗涤，如 60°C，2× Buffer C 洗涤 3 次，每次 5-10 min，37°C，2× Buffer C 洗涤 3 次，每次 5-10 min。
3. 石蜡切片酒精晾干这一步只要酒精挥发即可，不建议过长时间干燥，以免产生噪点。
4. **显微镜**：因干片造成的非特异性荧光的一大特点就是用不同的激发光都能激发出信号，可以通过切换不同滤光片观察荧光来排查；配备冷却 CCD 也能够有效降低图片背景。

问题 2. 目的基因信号不好，荧光弱？如何提高探针的荧光信号？

1. **优化浓度梯度**：提高探针杂交工作液中探针和 SA-Cy3 的含量，例如：
 - 1) 配制探针工作液：

若探针：SA-Cy3=1:1 时，则 1 μL (1 μM) 探针+1 μL (1 μM) SA-Cy3+8 μL 1× PBS，

若探针：SA-Cy3=2:1 时，则 2 μL (1 μM) 探针+1 μL (1 μM) SA-Cy3+7 μL 1× PBS，

若探针：SA-Cy3=3:1 时，则 3 μL (1 μM) 探针+1 μL (1 μM) SA-Cy3+6 μL 1× PBS，

若探针：SA-Cy3=4:1 时，则 4 μL (1 μM) 探针+1 μL (1 μM) SA-Cy3+5 μL 1× PBS，

然后将探针工作液置于 37°C 孵育 30 min。
 - 2) 配制探针混合液：取 10 μL 上述探针工作液+40 μL Buffer E（探针工作液与 Buffer E 的比例范围是 1:4-1:9），75°C 孵育 10 min，然后进行杂交。
2. **靶标丰度低**：针对丰度较低的靶标，可以在杂交一段时间后弃去原探针杂交缓冲液，二次加入新的探针杂交缓冲液并延长杂交时间。
3. **杂交温度**：适当降低杂交温度，比如 35、30°C，降低杂交温度可提高杂交灵敏度。
4. **显微镜**：显微镜的光源强度不足，建议使用不同荧光显微镜尝试，提高荧光探针信号需提高显微镜的配制，如光源（推荐卤素灯或汞灯）；
5. **探针保存**：溶解后以高浓度分装可长期保存，避免反复冻融。



GenePharma

股票代码：430601

吉玛基因
www.genepharma.com

6. 杂交或洗涤过程导致的信号弱，可以用阳性探针调整杂交和洗涤直至合适，灵活的按照操作步骤操作。

问题 3. 洗涤步骤具体怎么操作？

将洗涤液预热到洗涤温度后洗涤。烘箱洗涤时间如果较长比如 30 min，洗涤液可能会蒸发很多，所以建议洗涤较长时间时中途换液，或者有条件的可以在有一定湿度并且能设置温度的仪器中洗涤。

问题 4. 核内信号定位在核外？

1. 一般都是通透不充分，可以将 TritonX-100 用 PBS 配置更高浓度，如 0.5%的 Triton X-100 ， 4°C透膜 10-15 min。
2. 出现干片，应尽可能保持样品湿润。
3. 洗涤液应预热到相应温度。



A005-V001A-20210310