



GenePharma

股票代码: 430601

吉玛基因

www.genepharma.com

RNA FISH 试剂盒
SA-Biotin 系统
(细胞爬片) 说明书

如有疑问欢迎垂询

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>



B038-V003-20201215

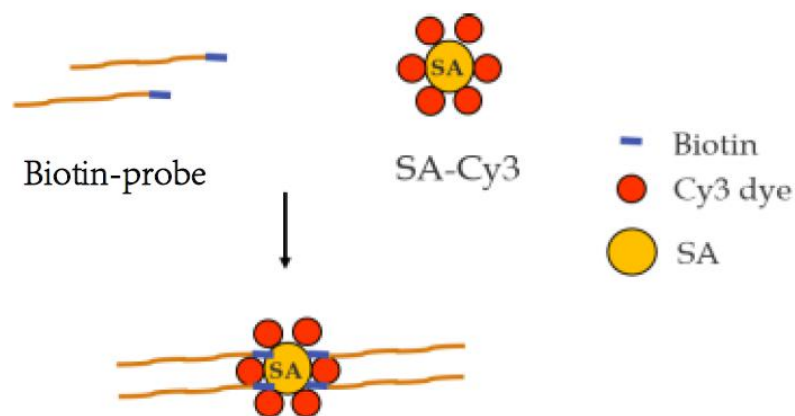


GenePharma
股票代码: 430601

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。传统的 RNA FISH, 直接在 oligos 上标记荧光染料, 根据碱基互补配对原则, 与待检测的 RNA 特异结合, 通过荧光显微镜检测荧光信号, 该方法一般需要 20 个 oligos 以上, 以便检测到较强较多的荧光信号点。

本系统中 SA (链霉亲和素蛋白) 是一类四聚体蛋白, 大小为 66 kDa, 每一分子 SA 能够与四分子生物素进行高度特异性的结合, 且两者之间的亲和力较强。应用该原理, 我们将染料 Cy3 偶联到 SA 蛋白上, 一分子 SA 能偶联上 6 个 Cy3; 同时在探针上标记生物素, 将两者在体外进行亲和连接, 大约每个 SA 能与 4 条 Biotin-probe 结合, 每个 SA 上有 6 个 Cy3, 也就是每一条探针上连接了 6 个 Cy3, 因此该方法具有一定的放大信号的作用。



SA-Biotin 系统原理示意图



GenePharma

股票代码: 430601

吉玛基因

www.genepharma.com

二、组分和保存条件

成分	容量 (50 tests)	容量 (100 tests)	储存
Buffer A (TritonX-100)	30 μ L	60 μ L	室温
Buffer C (20 \times SSC)	6 mL	12 mL	室温
Buffer E (杂交缓冲液)	8 mL	16 mL	室温
Buffer F (Tween 20)	50 μ L	100 μ L	室温
DEPC 水	6 mL	12 mL	-20 $^{\circ}$ C
DAPI	15 μ L	30 μ L	-20 $^{\circ}$ C
封闭液	100 μ L	200 μ L	4 $^{\circ}$ C
SA-Cy3	50 μ L	100 μ L	4 $^{\circ}$ C



GenePharma

股票代码: 430601

吉玛基因

www.genepharma.com

三、试剂配置

1. 0.1% Buffer A 配制: PBS 999 μL , Buffer A 1 μL , 且每次新鲜配制;
2. Buffer C 母液为 20 \times , 用一级纯水 (建议 DEPC 水) 稀释成 4 \times 、2 \times 使用;
3. 0.1% Buffer F 配制: 4 \times Buffer C 999 μL , Buffer F 1 μL , 且每次新鲜配制;
4. 封闭液为母液, 100 μL 封闭液用 1 \times PBS (PBS 建议用 DEPC 水配制) 定容至 5 mL 后可直接使用, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存;
5. SA-Cy3 浓度为 1 μM , 即用型试剂;
6. DAPI 工作液: DAPI 原液用 PBS 1000 倍稀释, 需避光保存和使用。

注意:

1. 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;
2. 实验过程中常用试剂, 如多聚甲醛等请您自备;
3. 实验过程中试剂建议用 DEPC 水配制;
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

4.1 贴壁细胞（以 48 孔板为例）

1. 按照 1×10^4 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），于培养箱中培养过夜；
2. 吸弃培养基，PBS 洗两次，每次 5 min；
3. 吸弃 PBS，每孔加入 100 μ L 4%多聚甲醛，室温固定 15 min；
4. 吸弃 4%多聚甲醛，每孔加入 100 μ L 0.1% Buffer A（现用现配）室温处理细胞 15 min（细胞通透）；
5. 吸弃 0.1% Buffer A，PBS 洗两次，每次 5 min；
6. 每孔加入 100 μ L 1 \times 封闭液，37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min；
7. 吸弃 1 \times 封闭液，每孔加入 100 μ L 2 \times Buffer C，37 $^{\circ}$ C 培养箱放置 30 min；
8. Buffer E 提前在 73 $^{\circ}$ C 水浴锅孵育 30 min，至澄清透亮；
9. 探针稀释：可参看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 μ L 灭菌 DEPC 水，混匀后即得浓度约为 100 μ M 的储存液，建议进行分装后避光储存于 -20 $^{\circ}$ C，避免多次冻融操作；
10. 配制探针工作液：将探针储存液稀释至 1 μ M，放入 75 $^{\circ}$ C 水浴锅变性 10 min，然后与 SA-Cy3 按比例加入到 PBS，（以 10 μ L 体系



GenePharma

股票代码: 430601

吉玛基因

www.genepharma.com

为例, 即 $1\ \mu\text{L}\ 1\ \mu\text{M}\ \text{biotin-probe} + 1\ \mu\text{L}\ 1\ \mu\text{M}\ \text{SA-Cy3} + 8\ \mu\text{L}\ \text{PBS}$), 37°C 孵育 30 min (可做预实验确定探针和 SA-Cy3 的比例, 例如 1:1, 2:1, 4:1, 8:1 等);

11. 将上述 $10\ \mu\text{L}$ 探针工作液和 $90\ \mu\text{L}$ Buffer E 混匀;
12. 吸弃 $2\times$ Buffer C, 每孔加入 $100\ \mu\text{L}$ 变性后的探针混合液, 采取避光措施后置于 37°C 培养箱中杂交过夜 (12-16 h);
13. 杂交次日, 将样本从 37°C 培养箱取出, 吸弃探针混合液, 每孔加入 $100\ \mu\text{L}\ 0.1\%$ Buffer F 于 37°C 洗涤 10 min;
14. 吸弃 0.1% Buffer F, 每孔加入 $100\ \mu\text{L}$ 的 $2\times$ Buffer C, 60°C 洗涤 10 min, 洗涤 3 次;
15. 吸弃 $2\times$ Buffer C, 每孔加入 $100\ \mu\text{L}$ 的 $2\times$ Buffer C, 37°C 洗涤 10 min, 洗涤 3 次 (如果背景深时, 建议适当提高洗涤温度及次数);
16. 吸弃 $2\times$ Buffer C, 每孔加入 $100\ \mu\text{L}$ 稀释后的 DAPI 工作液, 避光染色 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);
17. 吸弃 DAPI 工作液, PBS 洗涤 2 次, 每次 5 min;
18. 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)。

4.2 悬浮细胞

1. 将悬浮细胞固定在玻片上:



GenePharma

股票代码：430601

吉玛基因

www.genepharma.com

- 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 10 cm dish 中，滴加 100 μ L 0.1% Buffer A（现用现配）室温处理细胞 15 min（细胞通透）；
3. 吸弃 0.1% Buffer A，滴加 PBS 洗两次，每次 5 min；
4. 每张爬片滴加 100 μ L 1 \times 封闭液，37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min；
5. 吸弃封闭液，每张爬片滴加 100 μ L 2 \times Buffer C，37 $^{\circ}$ C 培养箱放置 30 min；
6. Buffer E 提前在 73 $^{\circ}$ C 水浴锅孵育 30 min，至澄清透亮；
7. 探针稀释：可参看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 μ L 灭菌 DEPC 水，混匀后即得浓度约为 100 μ M 的储存液，建议进行分装后避光储存于 -20 $^{\circ}$ C，避免多次冻融操作；
8. 配制探针工作液：将探针储存液稀释至 1 μ M，放入 75 $^{\circ}$ C 水浴锅变性 10 min，然后与 SA-Cy3 按比例加入到 PBS，（以 10 μ L 体系为例，即 1 μ L 1 μ M Biotin-probe + 1 μ L 1 μ M SA-Cy3 + 8 μ L PBS），



GenePharma

股票代码: 430601

吉玛基因

www.genepharma.com

-
- 37°C 孵育 30 min (可做预实验确定探针和 SA-Cy3 的比例, 例如 1:1, 2:1, 4:1, 8:1 等);
 9. 将上述 10 μ L 探针工作液和 90 μ L Buffer E 混匀;
 10. 准备湿盒, 水平放置爬片, 每张爬片滴加 100 μ L 变性后的探针混合液, 盖上盖玻片, 用封片胶封片;
 11. 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 μ L 变性后的探针混合液, 直接 37°C 培养箱孵育 12-16 h);
 12. 杂交次日, 将样本从 37°C 培养箱取出, 轻轻去掉盖玻片, 吸弃探针混合液, 每张爬片加入 100 μ L 0.1% Buffer F, 37°C 洗涤 10 min;
 13. 吸弃 0.1% Buffer F, 每张爬片加入 100 μ L 的 2 \times Buffer C, 60°C 洗涤 10 min, 洗涤 3 次;
 14. 吸弃 2 \times Buffer C, 每张爬片加入 100 μ L 的 2 \times Buffer C, 置于 37°C 洗涤 10 min, 洗涤 3 次 (如果背景深时, 建议适当提高洗涤温度及次数);
 15. 吸弃 2 \times Buffer C, 每张爬片加入 100 μ L 稀释后的 DAPI 工作液, 避光染色 10-20 min (根据细胞的种类, 建议适当调整 DAPI 的浓度及染色时间);
 16. 吸弃 DAPI 工作液, PBS 洗涤 2 次, 每次 5 min;
 17. 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



GenePharma

股票代码: 430601

吉玛基因

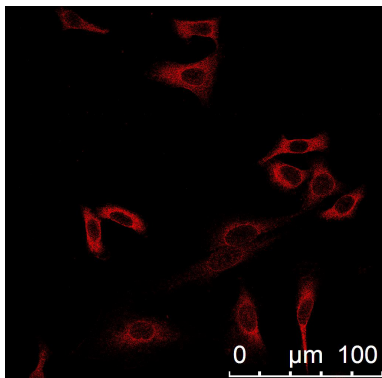
www.genepharma.com

观察（建议 2 天内完成拍摄）

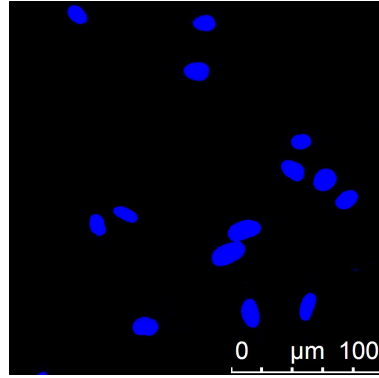
五、实验案例

5.1 贴壁细胞爬片

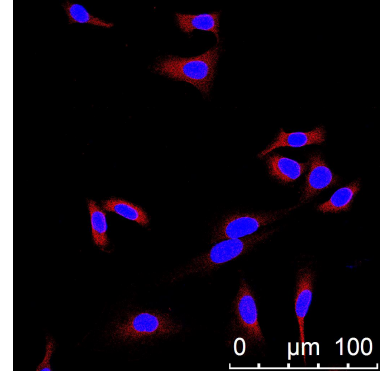
5.1.1 lncRNA



红光 (Cy3 标记探针杂交)

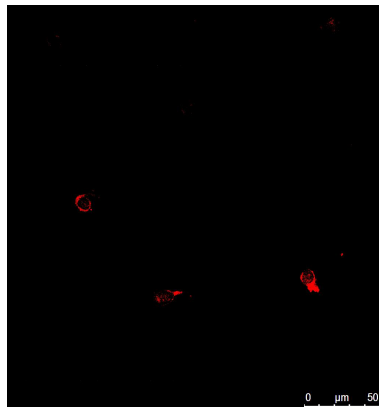


蓝光 (DAPI 染核)

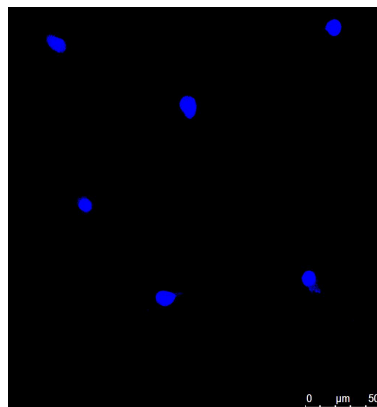


Merge

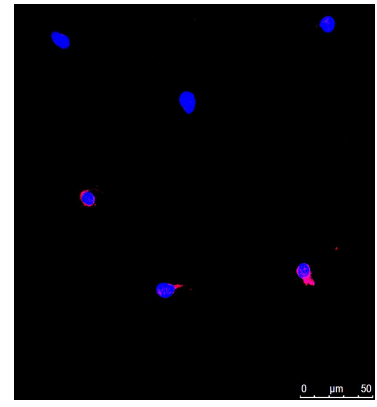
5.1.2 miRNA



红光 (Cy3 标记探针杂交)



蓝光 (DAPI 染核)



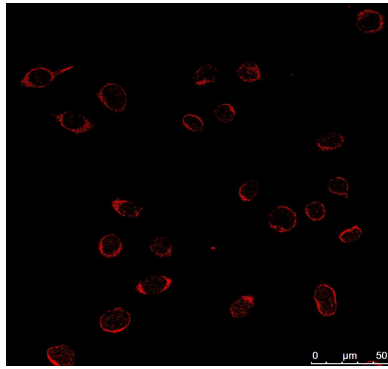
Merge



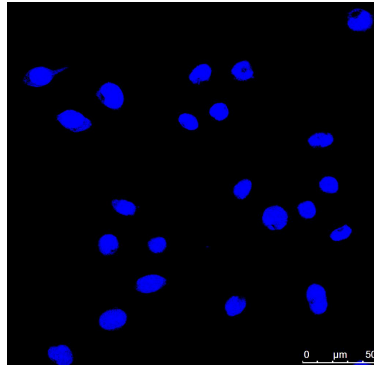
GenePharma
股票代码: 430601

吉玛基因
www.genepharma.com

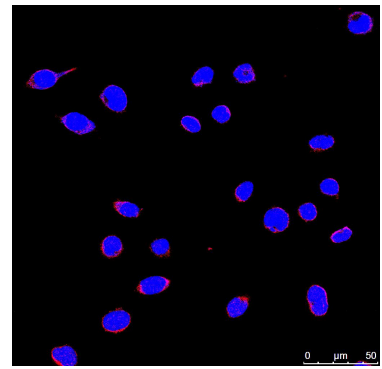
5.1.3 circRNA



红光 (Cy3 标记探针杂交)

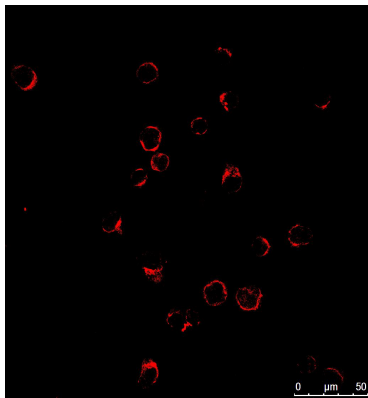


蓝光 (DAPI 染核)

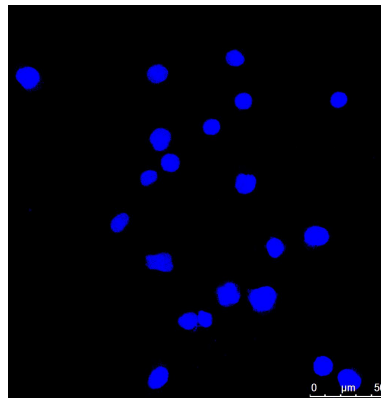


Merge

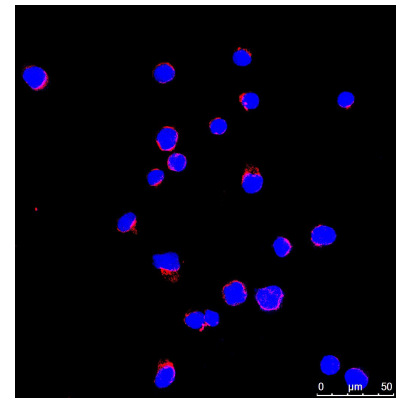
5.2 悬浮细胞烤片 (lncRNA)



红光 (Cy3 标记探针杂交)



蓝光 (DAPI 染核)



Merge