

RNA荧光原位杂交 (RNA-FISH) 试剂盒

Fluorescent In Situ Hybridization for RNA (RNA-FISH) Kit

注:本产品干冰运输;试剂按说明书分别保存于4°C及-20°C,保质期12个月。

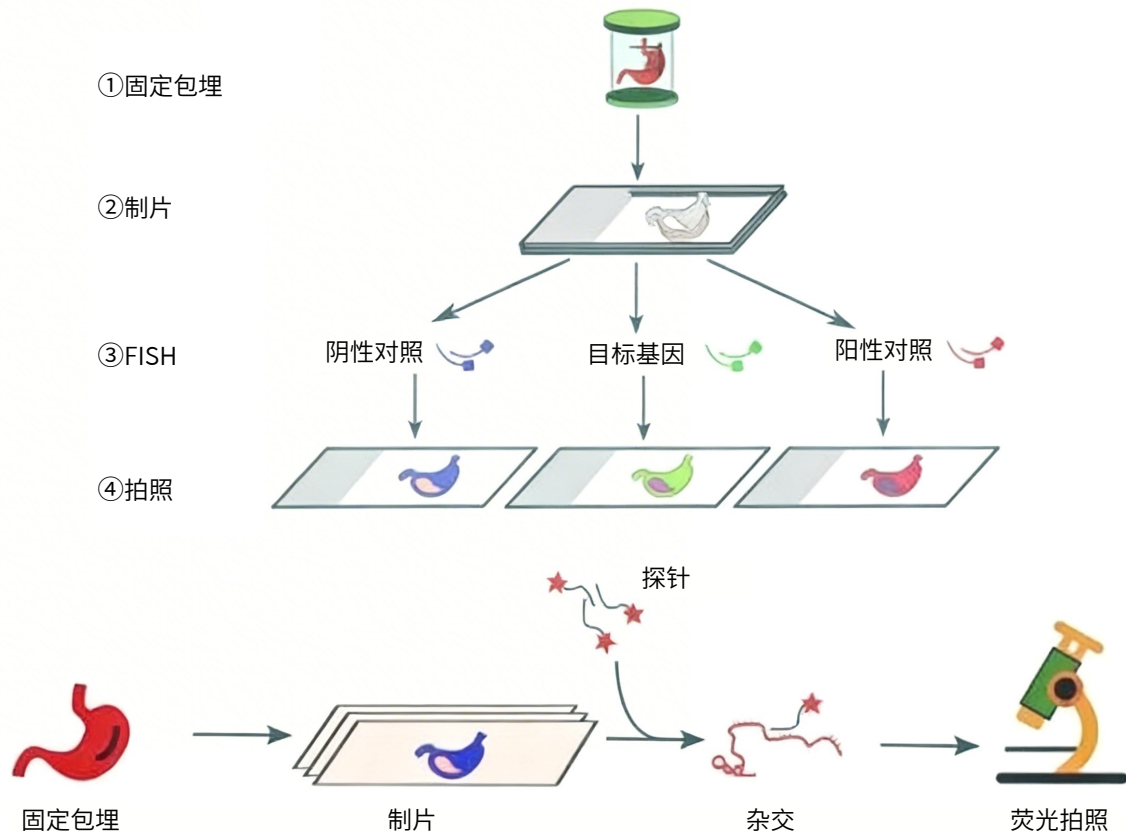
序号	试剂	货号及规格			储存
		IFH001 (25T)	IFH001M (50T)	IFH001L (100T)	
01	预杂交液	1.2 mL	2 mL	4 mL	4°C
02	抗荧光衰减封片剂	0.9 mL	1.5 mL	3 mL	4°C
03	洗液 I原液	24 mL	40 mL	80 mL	4°C
04	洗液 II原液	24 mL	40 mL	80 mL	4°C
05	洗液 III原液	24 mL	40 mL	80 mL	4°C
06	洗液 IV原液	24 mL	40 mL	80 mL	4°C
07	1×TBS	1.2 mL	2 mL	4 mL	4°C
08	蛋白酶 K (2mg/mL)	12 μL	20 μL	40 μL	-20°C
09	杂交液	1.2 mL	2 mL	4 mL	-20°C
10	DAPI	1.2 mL	2 mL	4 mL	-20°C
11	封片膜	50张	100张	150张	—

产品简介/Product Description

荧光原位杂交 (Fluorescent in situ hybridization, FISH) 是将经荧光素标记的寡聚核苷酸探针与变性

后的染色体、细胞或组织中的核酸按照碱基互补配对原则进行杂交，再经变性、退火、复性、洗涤后，形成靶 DNA 或 RNA 与核酸探针的杂交体。最后，在荧光显微镜下显影，从而对待测 DNA 或 RNA 进行定性和定位分析。

技术路线/Technology mapping



使用流程/Procedure

1. 样本前处理及制片

(1) 石蜡切片 / 组织芯片

①脱蜡：将石蜡切片置于二甲苯中，浸没脱蜡 3 次，每次 5min；

注意：脱蜡前将切片置于烘片机上，56°C 烘片 30min，使蜡软化；

②复水（选做）：依次经 100%、90%、80%、70% 乙醇梯度复水，每个梯度 5min；最后置于 DEPC 水中 5min，取出甩干水分。

注意：如若不进行通透步骤，此步骤省略；

③通透：

a（选做）：切片浸入通透液，室温静置 10min；弃去通透液，1×PBS 浸洗 3 次，每次 5min；

b（选做）：在切片上滴加 20~40μL 蛋白酶 K 工作液，盖上膜并保证均匀覆盖，37°C 孵育 10~15min；1×PBS 浸洗切片 2 次，每次 5min。

注意：

1. 石蜡切片样本经过前期处理，细胞结构已经被固定，细胞膜的功能也已经丧失。理论上不需要额外进行通透处理来改变细胞膜的通透性；若片子杂交效果不佳也可进行通透，增强杂交效率；

2. 通透 a、通透 b 为相同作用效果，同时进行可能会导致脱片，只需选其一进行通透即可。

④脱水：将石蜡切片经过 70%、80%、90%、100% 乙醇梯度脱水各 5min，室温干燥。

(2) 冰冻切片

①烘片及固定：从 -80℃取出冰冻切片，快速转移至预热的烘片机，56℃烘片 30min；切片浸入 4℃预冷的 90% 乙醇，室温固定 20min；室温静置干燥。

②通透：

a: 切片浸入通透液，室温静置 10min；弃去通透液，1×PBS 浸洗 3 次，每次 5min；

b: 在切片上滴加 20~40μL 蛋白酶 K 工作液，盖上膜并保证均匀覆盖，37℃孵育 10~15min；1×PBS 浸洗切片 2 次，每次 5min。

注意：通透 a、通透 b 为相同作用效果，同时进行可能会导致脱片，只需选其一进行通透即可。

③再固定及脱水：1% 多聚甲醛室温固定 10 min；1×PBS 清洗切片 1 次，5min；70%、80%、90%、100% 乙醇梯度脱水各 5min，室温干燥。

(3) 细胞爬片

a: 细胞爬片浸入通透液，室温静置 10min；弃去通透液，1×PBS 浸洗 3 次，每次 5min；

b: 在细胞爬片上滴加 20~40μL 蛋白酶 K 工作液，盖上膜并保证均匀覆盖，37℃孵育 10~15min；1×PBS 浸洗切片 2 次，每次 5min。

注意：通透 a、通透 b 为相同作用效果，同时进行可能会导致脱片，只需选其一进行通透即可。

③再固定及脱水：1% 多聚甲醛室温固定 10 min；1×PBS 清洗切片 1 次，5min；70%、80%、90%、100% 乙醇梯度脱水各 5min，室温干燥。

(4) 细胞涂片

①固定：细胞沉淀中加入 4% 多聚甲醛，充分悬浮后，室温固定 20min；加入 1mL DEPC 水洗涤 2 次，每次 5min；

②涂片：根据细胞量添加适量的 1×PBS，使细胞终浓度为 10^6 个 /ml；玻片上每个杂交区域滴加 10μL 细胞悬液，涂抹均匀；将涂好的玻片移至预热的烘片机，56℃烘片 30min；

③通透：

a: 涂片浸入通透液，室温静置 10min；弃去通透液，1×PBS 浸洗 3 次，每次 5min；

b: 在涂片上滴加 20~40μL 蛋白酶 K 工作液，盖上膜并保证均匀覆盖，37℃孵育 10~15min；1×PBS 浸洗切片 2 次，每次 5min。

注意：通透 a、通透 b 为相同作用效果，同时进行可能会导致脱片，只需选其一进行通透即可。

④再固定及脱水：1% 多聚甲醛室温固定 10 min；1×PBS 清洗切片 1 次，5min；70%、80%、90%、100% 乙醇梯度脱水各 5min，室温干燥。

(4) 细菌

①收集菌体：将细菌接种于 10mL TSB 培养基，27℃、210r/min 振荡培养 1~3d，将对数生长期的菌液移至 15mL 离心管，5000r/min 离心 2min，弃上清，收集菌体；

②菌体固定：加入 10mL 1×PBS，振荡器上充分振荡洗涤后，5000r/min 离心 2min，加入 4% 新鲜配制的多聚甲醛固定液，4℃固定过夜；加入 10mL 1×PBS 再次洗涤，5000r/min 离心 2min，弃上清，收集菌体；加入 2~3mL 50% 乙醇 /1×PBS-0.01%(V/V) Triton X-100 保存液，振荡器充分混匀，-20℃保存备用；

③制片：取 10μL 稀释到适当浓度的固定菌体，滴于载玻片中央，自然风干；分别用 50% 乙醇 -1×PBS、80% 乙醇 -1×PBS、100% 乙醇各脱水 3min，自然风干；将载玻片置于冰上，滴加 40μL 1g/L 溶菌酶溶液处理 20min；灭菌水来回冲洗 3 次以除去溶菌酶，自然风干。

2. 杂交

①预杂交：滴加 20~40μL 预杂交液于样本上，盖膜后，37℃孵育封闭 30min；

注意：操作过程中保持载玻片湿润，否则会引发非特异性结合信号；预杂交液用量视样本大小而定。

②配制杂交体系：在预杂交的同时配制杂交反应液：将探针与杂交液按 1:39 比例配制杂交反应液（参考体系：1 μL 探针 +39μL 杂交液），充分混匀，迅速置于冰上；

注意：

1. 单探针为 1 μ L 探针 +39 μ L 杂交液，双探针为 1 μ L 探针 A+1 μ L 探针 B+38 μ L 杂交液，如此类推，体系可依照实际情况改变浓度；

2. 杂交液应提前拿出恢复至室温后再使用。

③杂交：滴加 20~40 μ L 杂交反应液于待测样本上；盖膜后 73 $^{\circ}$ C 共变性 5~8min；快速转移至 37 $^{\circ}$ C 杂交过夜 (16h~20h)；

注意：加探针后，所有操作步骤应避光进行。

④洗涤：42 $^{\circ}$ C 预热的洗液 I、洗液 II、洗液 III、洗液 IV 各洗涤 1 次，每次 5min；

注意：洗液用量视样本大小而定，浸没泡洗。

⑤DAPI 染核：滴加 20~40 μ L DAPI，盖膜，避光染色 10min；1 \times PBS 洗涤 2 次，每次 5min，避光晾干。

注意：DAPI 用量视样本大小而定。

⑥荧光显微镜观察：滴加 10~30 μ L 抗荧光衰减封片剂封片；荧光显微镜 / 激光共聚焦拍照，或 -20 $^{\circ}$ C 避光暂存。

注意：封片剂用量视样本大小而定。

注意事项/Notes

1. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内；

2. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

