

Fluorescence in Situ Hybridization Kit for RNA

产品编号	产品名称	包装
R0306S	Fluorescence in Situ Hybridization Kit for RNA	100次
R0306M	Fluorescence in Situ Hybridization Kit for RNA	500次

产品简介:

- 碧云天研发生产的 Fluorescence in Situ Hybridization Kit for RNA (FISH Kit for RNA), 即荧光原位杂交RNA检测试剂盒, 是一种通过将荧光标记的寡核酸探针(DNA或RNA)与细胞或组织中的目标RNA按碱基互补配对原理进行杂交, 形成荧光标记核酸探针与目标RNA的杂交复合物, 随后就可以在荧光显微镜下观察并确定目标RNA细胞内定位的高灵敏度检测试剂盒。
- **本试剂盒操作简单便捷。**通常一天内即可完成检测。本试剂盒所使用的荧光标记核酸探针与靶RNA形成杂交复合物后, 就可以直接进行荧光观察。
- **本试剂盒背景低、灵敏度高。**本试剂盒提供了专门的乙酰化试剂, 并且提供了额外的封闭试剂Yeast RNA (100X), 能有效降低背景, 提高检测灵敏度。
- **本试剂盒样品适用范围广。**本试剂盒可用于多聚甲醛或福尔马林固定的组织、石蜡或冰冻切片以及细胞等样本的靶RNA的定位分析。本试剂盒适用于样品的异质性(sample heterogeneity)检测, 非编码RNA (包括miRNA和lncRNA等)的单细胞水平的高灵敏度检测, 基因组来源RNA的追踪检测以及目标RNA的高通量单细胞定量检测(high-throughput single-cell quantitation)。
- **本试剂盒可以提供目标RNA的单细胞空间分布信息。**基因的表达分析通常采用转录组测序、qPCR、Northern、基因微阵列芯片等技术[1], 尽管这些技术提供了大量信息, 但这些检测方法很容易掩盖单细胞基因表达的差异性, 特别是RNA在细胞内的空间分布特性, 采用本试剂盒可以特异且高灵敏地揭示单细胞水平基因表达的空间分布情况。
- **本试剂盒兼容后续荧光染色。**本试剂盒具有较好的荧光兼容性, 除特异杂交的荧光探针信号外, 还可以配合DAPI (C1002/C1005/C1006), Hoechst 33342染色液(C1025/C1026), Hoechst 33258染色液(C1017/C1018), Propidium Iodide (ST511/ST512)等荧光染料。
- 碧云天Fluorescence in Situ Hybridization Kit for RNA使用Cy3标记的红色荧光探针检测Hela细胞18S rRNA的原位杂交效果请参考图1。

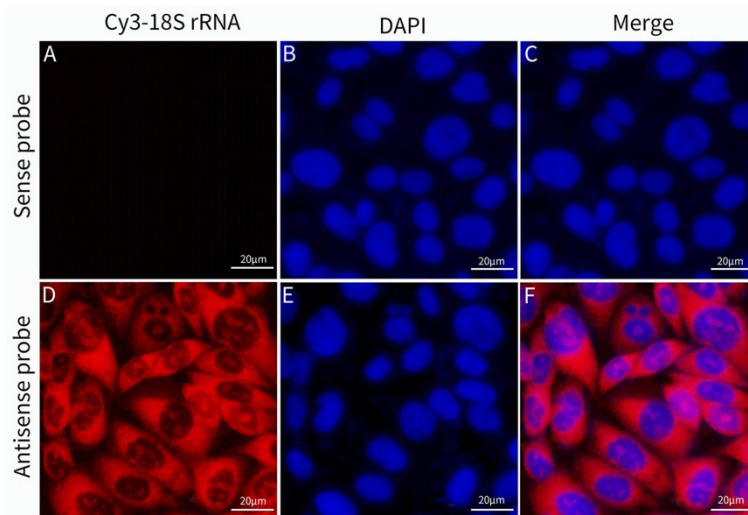


图1. 碧云天研发生产的Fluorescence in Situ Hybridization Kit for RNA (R0306)用于Hela 细胞18S rRNA的荧光原位杂交(FISH)检测效果图。图A为使用阴性对照探针0.5µg/ml Cy3-18S rRNA sense probe的FISH检测效果图, 图B为DAPI染色效果图, 图C为图A和图B的叠加图效果; 图D为使用阳性红色荧光探针0.5µg/ml 18S rRNA Cy3 FISH Probe (R0312)即Cy3-18S rRNA antisense probe的FISH检测效果图, 图E为DAPI染色效果图, 图F为图D和图E的叠加效果图。Scale Bar均为20µm。实际结果会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异, 图中效果仅供参考。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
R0306S-1	Proteinase K (20mg/ml)	50µl

R0306S-2	Acetylation Solution A	300µl
R0306S-3	Acetylation Solution B	100ml
R0306S-4	Hybridization Solution	50ml
R0306S-5	Yeast RNA (100X)	500µl
R0306S-6	DAPI (5mg/ml)	100µl
R0306S-7	Wash Buffer (20X)	20ml
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
R0306M-1	Proteinase K (20mg/ml)	250µl
R0306M-2	Acetylation Solution A	1.5ml
R0306M-3	Acetylation Solution B	500ml
R0306M-4	Hybridization Solution	250ml
R0306M-5	Yeast RNA (100X)	2.5ml
R0306M-6	DAPI (5mg/ml)	500µl
R0306M-7	Wash Buffer (20X)	100ml
—	说明书	1份

保存条件：

-20°C保存，一年有效。Proteinase K (20mg/ml)和Yeast RNA (100X)须-20°C保存；Hybridization Solution和DAPI须-20°C避光保存；Acetylation Solution A, Acetylation Solution B和Wash Buffer (20X)可4°C或室温保存。

注意事项：

- 建议尽量使用新鲜样品进行FISH检测，固定后保存的样品，RNA通常会随着时间的延长而逐步发生降解，影响FISH的检测效果。
- 需要自备的试剂：BeyoPure™ Ultrapure Water (DNase/RNase-Free, Sterile) (ST876)或DEPC水(R0021/R0022)、4%多聚甲醛固定液(P0099)、PBS, pH7.3 (DNase, RNase & Protease free, Sterile) (ST447)、盐酸、Formamide deionized、抗荧光淬灭封片液(P0126)、多聚赖氨酸(C0312/C0313/ST508/ST509) (酌情自备)、盖玻片(FCGF24/ FCGF22) (酌情自备)、冰冻或石蜡切片相关试剂(酌情自备)、目标RNA荧光探针(须自行购买或合成)。
- 对于常规的哺乳动物细胞或组织样品的检测，Hybridization Solution使用前通常可以添加Yeast RNA后使用，可以有效降低背景。对于Yeast RNA可能产生干扰的情况，可以不添加Yeast RNA。
- 建议Hybridization Solution适当分装后避光保存。
- 预杂交温度确定后，通常后续的探针预处理、杂交、洗涤的温度宜保持一致。
- 任何一种试剂都必须全部解冻并混匀后使用。
- 由于涉及 RNA 操作，需要严格按照 RNA 操作的规范进行，避免 RNase 污染。实验中用到的吸头、离心管和检测涉及的器具和相关溶液都必须是无RNA酶污染的(RNase free)。推荐使用碧云天生产的BeyoGold™系列中明确标注RNase free的耗材产品。实验中用到的玻璃或塑料器具、仪器设备、桌面等表面也尽量进行RNase free处理。推荐清洗或擦拭后使用碧云天生产的R0127 RNase, DNase, RNA and DNA Away参考产品说明书通过喷雾处理快速、便捷、高效地清除实验仪器、设备、器具表面的RNase 污染。RNase, DNase, RNA and DNA Away处理后，仪器设备等表面可以使用洁净纸巾擦拭干净，和样品直接接触的器具表面可以使用不含RNase的超纯水适当冲洗数次。不含RNase的超纯水推荐使用碧云天的ST876 BeyoPure™ Ultrapure Water (DNase/RNase-Free, Sterile)或R0021/R0022 DEPC水(DNase, RNase free)。
- 推荐使用R0312 18S rRNA Cy3 FISH Probe或R0323 U6 snRNA Cy3 FISH Probe作为阳性对照，分别可以对细胞浆中的18S rRNA或细胞核中的U6 snRNA进行荧光染色。
- 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。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明：

1. 样品制备：

a. 细胞样品

- 细胞培养：细胞培养至6孔、12孔或24孔板上或盖玻片上(可以酌情使用多聚赖氨酸进行预处理)，待细胞密度达到70-90%时，用PBS洗涤细胞2-3次。注：对于很多细胞，使用多聚赖氨酸预处理可以有效防止后续的检测过程中细胞发生脱落。
- 固定：加入4%多聚甲醛固定液(P0099)室温固定10分钟。大多数细胞固定10分钟即可，最佳固定时间可适当调整。
- 洗涤：去除固定液，用PBS (DNase/RNase free)室温摇床缓慢摇动洗涤3次，每次5分钟。
注1：如果细胞容易脱落，也可以不进行摇动，可酌情延长洗涤时间或增加洗涤次数。后续所有的细胞或切片的洗涤如果容易脱落，也都可以不进行摇动，并都可以酌情延长洗涤时间或增加洗涤次数。
注2：后续使用的PBS均须为DNase/RNase free。

b. 冰冻切片

(a) 新鲜组织用4%多聚甲醛固定液(P0099)固定, 固定时间根据组织大小而定, 建议1-2小时。切片厚度5-10 μ m左右, 烘干。

(b) 洗涤: 用PBS室温摇床洗涤3次, 每次5分钟。

c. 石蜡切片

(a) 制片: 新鲜组织用4%多聚甲醛固定液(P0099)固定。固定时间根据组织大小而定, 建议1-2小时。切片厚度最好不超过4 μ m, 烘干。

(b) 脱蜡: 二甲苯洗涤2次, 每次3分钟, 再用二甲苯/乙醇(1:1)溶液洗涤3分钟。

(c) 复水: 依次用100%、100%、95%、70%、50%乙醇洗涤, 各洗涤3分钟, 再用超纯水(DNase/RNase free)洗涤2次, 每次5分钟。

2. 细胞通透:

a. 通透: 加入适量5-20 μ g/ml Proteinase K (用PBS配制), 室温消化2-10分钟。

注1: 最佳的Proteinase K浓度和时间取决于细胞组织类型和切片厚度, 建议尝试Proteinase K浓度梯度来确定最佳条件。

注2: 如果通透效果不够理想, 可以在Proteinase K消化结束后, 尝试增加含0.5% Triton X-100的PBS室温摇床洗涤样品5分钟。

b. 洗涤: 用PBS摇床洗涤2次, 每次5分钟。

c. 固定: 用4%多聚甲醛固定液(P0099)室温固定10分钟。

d. 洗涤: 去除固定液, 用 PBS摇床洗涤2次, 每次5分钟。

3. 降低背景:

a. 中和碱性蛋白: 加入适量0.5M HCl浸没细胞, 室温摇床洗涤5分钟。

b. 洗涤: 用PBS摇床洗涤2次, 每次5分钟。

c. 乙酰化作用: 将Acetylation Solution A 和Acetylation Solution B按照1:400的比例混合均匀, 配制Acetylation Solution。加入适量Acetylation Solution浸没样品, 室温摇床洗涤10分钟。

注: Acetylation Solution须现配现用。

d. 洗涤: 用PBS摇床洗涤2次, 每次5分钟。

4. 杂交:

a. 试剂配制(RNase free 操作)

(a) 含探针的杂交液: 取适量Hybridization Solution, 按照1:100加入Yeast RNA (100X)并混匀, 加入探针至最终浓度为0.5-1 μ g/ml, 尽量避光配制。

注1: 探针的浓度可根据实际情况进行适当优化。

注2: Yeast RNA (100X)通常可以加入以降低背景, 但如果会导致产生非特异性杂交信号可以选择不加入。

(b) Wash Buffer I: 用超纯水(DNase/RNase free)将Wash Buffer (20X)稀释至4X, 再将Formamide deionized与4X Wash Buffer按照1:1混合均匀。

注: 使用时须提前预热至杂交温度。

(c) Wash Buffer II: 用超纯水(DNase/RNase free)将Wash Buffer (20X)稀释至2X, 混匀。

注: 使用时须提前预热至杂交温度。

(d) Wash Buffer III: 用超纯水(DNase/RNase free)将Wash Buffer (20X)稀释至1X, 混匀。

注: 使用时须提前预热至杂交温度。

b. 预杂交: 加入适量含Yeast RNA (1X)的Hybridization Solution浸没细胞, 样本密封, 防止蒸发, 放置24-65 $^{\circ}$ C避光摇床孵育20分钟。

注1: 探针预杂交温度低于探针T_m值22-25 $^{\circ}$ C。

注2: 后续的探针预处理、杂交、洗涤的温度都和预杂交的温度保持一致。

注3: 通常推荐使用含Yeast RNA (1X)的Hybridization Solution进行预杂交以降低背景, 但如果后续会导致产生非特异性杂交信号可以选择不加入。

c. 探针预处理: 将含探针的杂交液放置24-65 $^{\circ}$ C避光摇晃20分钟后, 立刻冰浴2分钟, 适当混匀后冰浴放置备用。

d. 杂交: 去除Hybridization Solution, 滴加含探针的杂交液浸没样本, 密封后放置24-65 $^{\circ}$ C避光摇床杂交2-12小时。

注: 较短探针(约20nt)杂交2-3小时即可, 探针较长(约500nt)杂交时间可适当延长。

e. 探针回收: 将含探针的杂交液回收至洁净离心管中, -20 $^{\circ}$ C避光保存。

f. 洗涤I: 加入适量预热的Washing Buffer I, 24-65 $^{\circ}$ C避光摇床洗涤3次, 每次5-20分钟。

注: 洗涤时间与探针长度成正比, 例如较短探针(20nt左右)洗涤5分钟; 较长探针(约500nt)时, 建议适当延长洗涤时间。

g. 洗涤II: 加入适量预热的Washing Buffer II, 24-65 $^{\circ}$ C避光摇床5-20分钟, 1次。

h. 洗涤III: 加入适量预热的Washing Buffer III, 24-65 $^{\circ}$ C避光摇床5-20分钟, 1次。

5. 细胞核染色:

a. 清洗: 用PBS避光摇床洗涤2次, 每次5分钟。

b. 细胞核染色: 使用适量0.5-10 μ g/ml DAPI染色液浸没细胞, 避光染色3-5分钟。

注: 样本较大或较厚时建议适当延长染色时间; 也可使用Hoechst 33342染色液(C1025/C1026)、Hoechst 33258染色液(C1017/C1018)、Propidium Iodide (ST511/ST512)等细胞核染料染色。

c. 洗涤: 用PBS避光摇床洗涤2次, 每次5分钟。

6. **拍照与保存：**此时可以直接在荧光显微镜下拍照，也可以去除PBS，滴加抗荧光淬灭封片液(P0126)或抗荧光淬灭PVP封片液(P0123)浸没细胞，盖上盖玻片，荧光显微镜下拍照。拍照后样品可放置4℃避光保存。

常见问题：

1. 为什么细胞或切片会脱落？

- 固定不充分。建议适当延长固定时间。
- 蛋白酶消化过度。适当降低蛋白酶浓度或缩短消化时间，消化后再次使用4%多聚甲醛固定液固定10分钟，固定时间可酌情适当调整。
- 组织或细胞粘附性差。尝试不同的细胞外基质包被载玻片或盖玻片，例如多聚赖氨酸(C0312/C0313/ST508/ST509)或胶原蛋白，促进细胞和组织切片的粘附。
- 洗涤过于剧烈。建议缓慢加入或吸去试剂，避免溶液直冲细胞；同时可以考虑尽量减慢摇床速度，甚至不进行摇动。但不进行摇动时，一定要注意适当延长作用时间。

2. 为什么细胞外会出现非特异性荧光信号？

- 探针与包被材料非特异结合。建议通过探针杂交有或无包被材料的载玻片或盖玻片来验证包被材料。
- 清洗不充分，样品上有杂质粘附。较多细胞碎片等杂质未洗净，建议所有洗涤步骤的洗涤时间增加5分钟。
- 样品晾干。在实验过程中，确保加入足够的溶液一直覆盖整个样品，更换溶液时需要逐个样品进行操作，吸净溶液后，需要立即加入后续的溶液，避免样品干燥。
- 试剂中存在杂质。如PBS等试剂未过滤去除杂质或沉淀物，建议相关溶液过滤后使用。

3. 为什么细胞内部出现较高荧光背景？

- 探针非特异性。通常可以通过不加探针、使用阴性样品或使用sense probe杂交作为阴性对照，来判断是否为非特异性染色。如果阴性对照结果正常，antisense probe杂交有明显的非特异性染色现象，可适当降低探针浓度，并在探针杂交后适当延长洗涤时间。如果sense probe杂交也出现信号，说明探针具有非特异性，建议更换特异性探针。
- 样品自发荧光。一些细胞或组织样品可能会表现出较高的自发荧光。建议在实验前确定样品是否存在与探针荧光波长相近的自发荧光，如果有这样的情况，建议更换样品或更换不同波长的荧光探针。
- 洗涤不充分。在样品固定后及杂交后，所有洗涤步骤增加洗涤液的量或适当延长洗涤时间。
- 样品晾干。在实验过程中，确保加入足够的溶液一直覆盖整个样品，更换溶液时需要逐个样品进行操作，吸净溶液后，需要立即加入后续的溶液，避免样品干燥。

4. 为什么样品整体出现较高且均匀的背景？

- 荧光显微镜设置不正确。检查荧光显微镜设置和成像系统，并进行正确设置。
- 使用的封片液的成分存在自发荧光。显微镜下，检查载玻片上的封片液是否具有自发荧光特性。如有，需要更换使用没有自发荧光的封片液。

5. 如何提高荧光标记探针的检测灵敏度？

荧光标记核酸探针的检测灵敏度与标记探针长度、标记密度或标记度、目标分子丰度等因素有关。较长的探针(例如300-700nt)可标记更多的荧光染料，从而提高检测灵敏度。但探针过长，渗透性会降低，反而会会影响检测灵敏度。

6. 为什么会荧光信号很弱或无荧光信号？

- 蛋白酶K消化不充分。建议调整蛋白酶K浓度或延长消化时间。
- 固定不充分。建议适当延长固定时间。
- 杂交温度偏高。建议尝试较低的杂交温度，此时相对比较容易检测到荧光信号，但也有可能会导致荧光背景的升高。
- 目标基因在被检测的细胞中没有表达或表达很低。使用阳性探针检测验证，例如18S rRNA或U6 snRNA荧光探针。
- 探针荧光淬灭。荧光探针在使用和保存期间，须注意避光。杂交、洗涤等过程中需要尽量做好避光操作。荧光显微镜下观察时，需要尽量减少被激发光照射的时间。对于荧光已淬灭的情况，通常建议在低倍镜下先进行初步的观察，然后快速切换到20倍或40倍物镜下进行拍照，拍照完成后，关闭激发光或切换到低倍物镜下寻找下一个合适的视野。
- 试剂未作用于细胞样品。特别是细胞爬片，应确保含有细胞的面朝上，并用免疫组化笔做好标记。
- 荧光显微镜设置或操作不当。确保显微镜和拍照系统处于良好的工作状态。
- RNA发生降解。需要确保所使用的溶液、器具都是DNase/RNase free的。

7. 核定位的 RNA，为什么核内没有信号？

- 通透不充分。建议进行步骤2a时，在Proteinase K消化结束后，尝试增加用含0.5% Triton X-100的PBS室温摇床洗涤细胞5分钟。
- 样品晾干。在实验过程中，确保加入足够的溶液一直覆盖整个样品；更换溶液时，须避免样品干燥。
- 洗涤不充分。适当延长洗涤时间。注意使用指定的Washing Buffer，不可替换为其它溶液，且使用前需预热。
- RNA发生降解。需要确保所使用的溶液、器具都是DNase/RNase free的。

8. 为什么样品信号分布不均匀。

- 样品晾干。在实验过程中，确保加入足够的溶液一直覆盖整个样品，更换溶液时，须避免样品干燥。
- 杂交液使用不当。杂交液使用前应预热以充分溶解沉淀物并混匀。

参考文献：

- Sriram K, Wiley SZ, Moyung K, Gorr MW, Salmerón C, et al. ACS omega. 2019. 4(16):17048-17059.

相关产品:

产品编号	产品名称	包装
R0306S	Fluorescence in Situ Hybridization Kit for RNA	100次
R0306M	Fluorescence in Situ Hybridization Kit for RNA	500次
R0312-20µg	18S rRNA Cy3 FISH Probe	20µg
R0312-100µg	18S rRNA Cy3 FISH Probe	100µg
R0323-20µg	U6 snRNA Cy3 FISH Probe	20µg
R0323-100µg	U6 snRNA Cy3 FISH Probe	100µg
ST508	Poly-D-lysine/多聚赖氨酸	10mg
ST509	Poly-L-lysine/多聚赖氨酸	50mg
C0313-5mg	Poly-L-lysine溶液	5mg
C0313-25mg	Poly-L-lysine溶液	25mg
C0313-100mg	Poly-L-lysine溶液	100mg
C0312	Poly-D-lysine溶液	2mg
ST535-100mg	Proteinase K	100mg
ST535-500mg	Proteinase K	500mg
ST535-2g	Proteinase K	2g
ST532	Proteinase K (20mg/ml)	0.2ml
ST533	Proteinase K (20mg/ml)	1ml
ST537-100mg	Recombinant Proteinase K (重组蛋白酶K)	100mg
ST537-500mg	Recombinant Proteinase K (重组蛋白酶K)	500mg
ST537-2g	Recombinant Proteinase K (重组蛋白酶K)	2g
ST537-10g	Recombinant Proteinase K (重组蛋白酶K)	10g
ST537-50g	Recombinant Proteinase K (重组蛋白酶K)	50g
P0098-100ml	免疫染色固定液	100ml
P0098-500ml	免疫染色固定液	500ml
P0099-100ml	4%多聚甲醛固定液	100ml
P0099-500ml	4%多聚甲醛固定液	500ml
ST036	DEPC	10g
R0021	DEPC水(DNase、RNase free)	100ml
R0022	DEPC水(DNase、RNase free)	500ml
ST1249-2ml	DEPC (≥97%, Reagent grade)	2ml
ST1249-10ml	DEPC (≥97%, Reagent grade)	10ml
C0221A	PBS	500ml
ST447-1L	PBS (1X, premixed powder)	1L
ST447-5L	PBS (1X, premixed powder)	5×1L
ST476	PBS (10X)	500ml
ST448-1L	PBS (10X, premixed powder)	1L
C1002	DAPI	5mg/ml×0.2ml
C1005	DAPI染色液	10ml
C1006	DAPI染色液	50ml
C1011	Hoechst 33258	10mg
P0123-5ml	抗荧光淬灭PVP封片液	5ml
P0123-25ml	抗荧光淬灭PVP封片液	25ml
P0126-5ml	抗荧光淬灭封片液	5ml
P0126-25ml	抗荧光淬灭封片液	25ml
P0131-5ml	抗荧光淬灭封片液(含DAPI)	5ml
P0131-25ml	抗荧光淬灭封片液(含DAPI)	25ml
P0133-5ml	抗荧光淬灭封片液(含Hoechst 33342)	5ml
P0133-25ml	抗荧光淬灭封片液(含Hoechst 33342)	25ml
P0137-5ml	抗荧光淬灭封片液(含Hoechst 33342和PI)	5ml
P0137-25ml	抗荧光淬灭封片液(含Hoechst 33342和PI)	25ml

P0135-5ml	抗荧光淬灭封片液(含PI)	5ml
P0135-25ml	抗荧光淬灭封片液(含PI)	25ml
P0128S	抗荧光淬灭封片液(强)	5ml
P0128M	抗荧光淬灭封片液(强)	25ml
FTUB515	BeyoGold™ 15毫升锥形离心管	25个/包,20包/箱
FTUB550	BeyoGold™ 50毫升锥形离心管	25个/包,20包/箱
FSL051	粘附载玻片(表面带正电荷)	50片/盒
FCGF22	精装盖玻片(22×22)	200片/盒
FCGF24	精装盖玻片(24×24)	200片/盒
FCGF32	精装盖玻片(24×32)	100片/盒
FG005	5片装载玻片染色缸	1个/盒

Version 2022.09.24