

Ribo™ Fluorescent In Situ Hybridization Kit 使用说明

RN: R11060.7

产品简介

Ribo™ Fluorescent In Situ Hybridization Kit 为 Ribo™ lncRNA FISH Probe Mix 的配套试剂盒。锐博生物开发的 Ribo™ lncRNA FISH Probe Mix, 创新性地改进了 lncRNA 分子的特异性探针设计方法及标记方式, 极大地提高了探针灵敏度, 可以从细胞中对转录水平较低的 lncRNA 进行准确定位, 结合激光共聚焦显微镜可清晰地检测 lncRNA 分布情况。

组分	试剂名称	浓度	C10910 (100T)	存储条件
试剂 A	Pre-hybridization Buffer	1X	10 mL X 2	避光 低温存储
试剂 B	Hybridization Buffer	1X	10 mL	
试剂 C	Blocking Solution	100X	300 μL	
试剂 D	DAPI 染色液	100X	200 μL	

运输保存

产品为**常温运输**。收到产品后, 请于-20℃以下**低温避光**保存, 可以稳定保存一年。

使用方法

试剂准备

- 1) lncRNA Probe Mix 储存液 (20 μM), 恢复至室温。
- 2) U6, 18S 内参探针储存液 (20 μM), 恢复至室温。
- 3) 预杂交液: 将适量 Blocking Solution 与 Pre-hybridization Buffer 按照 1: 99 混匀后, 37℃孵育至透明澄清状态 (约 30 min) 后, 分装保存。在使用前, 须在 37℃气浴或水浴中孵育至澄清透明。
- 4) 杂交液: 将适量 Blocking Solution 与 Hybridization Buffer 按照 1: 99 混匀, 37℃孵育 30 min 后分装保存。在使用前, 须先在 37℃气浴或水浴中孵育 30 min。杂交液颜色偏黄属于正常现象。

注: Pre-hybridization Buffer (试剂 A) 和 Hybridization Buffer (试剂 B) 从低温取出时可能有沉淀析出, 属于正常现象。

- 5) 将适量 100X DAPI 染色液 (试剂 D) 与 PBS 按照 1: 99 混匀, 制备 1X DAPI 染色液。

客户自备

- 1) 4% 多聚甲醛
- 2) 通透液 (含 0.5% Triton X-100 的 PBS)
- 3) 1X PBS
- 4) 4X SSC
- 5) 杂交洗液 I (4X SSC, 0.1% Tween-20)
- 6) 杂交洗液 II (2X SSC)
- 7) 杂交洗液 III (1X SSC)
- 8) 封片剂

细胞实验方法

以 24 孔板培养 HeLa 细胞爬片以进行 FISH 实验为例：

注：不同细胞系需根据其自身特性进行优化和调整实验条件（固定、通透、杂交和洗脱），如在预实验中发现杂交效果不好或者背景太高，请适当地调整反应时间与洗脱强度。

1. 细胞培养

将细胞爬片置于 24 孔板孔底，培养适量细胞（ $\sim 6 \times 10^4$ /孔）。实验前使细胞融合度达到 60%-70%。

注：爬片与底板间不要产生气泡。

2. 细胞固定与通透

a. 【1X PBS】清洗细胞 5 min；

b. 【4%多聚甲醛】室温固定 10 min；

c. 【1X PBS】清洗细胞 5 min，共 3 次；

d. 每孔加入 1 mL 预冷的【通透液】，4 °C 静置 5 min；

e. 弃去【通透液】后，加入【1X PBS】清洗细胞 5 min，3 次。

3. 探针检测

a. 每孔加入 200 μ L【预杂交液】，37 °C 封闭 30 min；

b. 预杂交同时，将【杂交液】在 37 °C 中预热；

c. 避光条件下，把 2.5 μ L 20 μ M【lncRNA FISH Probe Mix 储存液】或【内参 FISH Probe Mix 储存液】加入到 100 μ L【杂交液】中；

注：探针浓度可根据具体实验情况进行优化。

d. 弃去每孔细胞中的【预杂交液】，加入 100 μ L 含有探针的【探针杂交液】，避光，37 °C 杂交过夜；

注：探针杂交液的用量具体依据细胞爬片待杂交区域优化，只需保证细胞能充分接触杂交液并且不出现干片的情况即可。

e. 避光，42 °C，【杂交洗液 I】清洗每孔细胞 3 次，每次 5 min，以降低背景信号；

f. 避光，42 °C，【杂交洗液 II】清洗细胞 1 次；

g. 避光，42 °C，【杂交洗液 III】清洗细胞 1 次；

h. 避光，【1X PBS】清洗细胞，室温 5 min。

注：所有指定温度的步骤，注意将相关试剂预热到对应实验所需温度后再使用。

4. DNA 染色

a. 避光，【1X DAPI 染色液】染色 10 min，染色液用量以覆盖待杂交区域所有细胞为宜；

b. 避光，【1X PBS】清洗细胞 3 次，每次 5 min。

5. 封片

避光条件下，从孔中小心取出细胞爬片，用封片剂将其固定于载玻片上，进行荧光检测。

注：1）小心取出细胞爬片，避免碰到细胞造成的损失。2）Ribo™ lncRNA FISH Probe Mix(Red)使用了 Cy3 标记，最大激发光长为 555 nm，最大发射波长为 570 nm，请选择合适的仪器及检测条件进行检测，推荐采用共聚焦显微镜进行检测。

相关产品

产品编号	产品名称	规格
Varies	Ribo™ lncRNA FISH Probe Mix(Red)	20T
lnc110101	Ribo™ h-U6 FISH Probe Mix(Red)	20T
lnc110102	Ribo™ h-18S FISH Probe Mix(Red)	20T
lnc110103	Ribo™ m-U6 FISH Probe Mix(Red)	20T
lnc110104	Ribo™ m-18S FISH Probe Mix(Red)	20T
lnc110105	Ribo™ r-U6 FISH Probe Mix(Red)	20T
lnc110106	Ribo™ r-18S FISH Probe Mix(Red)	20T

FAQ

1. Ribo™ Fluorescent In Situ Hybridization Kit 和 Ribo™ lncRNA FISH Probe Mix 搭配是否可以用于组织切片原位杂交检测？

答：Ribo™ Fluorescent In Situ Hybridization Kit 和 Ribo™ lncRNA FISH Probe Mix 的应用目的为检测 lncRNA 在细胞样品中的亚细胞定位，未针对组织切片样品进行测试，故不确定在组织切片上使用的效果。如确有需要，可以考虑自行尝试，可能实验条件等需要根据样品性质等进行优化。

2. Ribo™ lncRNA FISH Probe Mix 中混合了多少探针？

答：Ribo™ lncRNA FISH Probe Mix 是多探针混合物，按照锐博生物的探针设计方法，若设计的探针数目大于 20，则按位置及序列情况挑选 20 条左右序列组成探针混合物，若少于 20 条探针，则选取所有探针组成混合物。

3. 预杂交液和杂交液是否可以不分装保存，只是在每次实验时取出适量试剂？

答：预杂交液和杂交液的保存条件为-20℃低温保存，在低温情况下有个别试剂析出，每次使用时需将析出的沉淀彻底溶解混匀后方可使用，为避免溶解混匀不充分及反复冻融的问题，建议第一次实验时即将预杂交液和杂交液置于 37℃ 条件下，使析出的沉淀彻底溶解，加上 Blocking Solution 混匀后分装保存，以后每次取一管或数管进行实验。注意预杂交液和杂交液的沉淀一定要完全溶解后才能使用。

4. 理论上应该核定位的 RNA，FISH 检测结果信号主要在细胞质中，核内没有信号，这是什么情况？

答：主要可能原因如下：

- 1) 通透不充分，未对核膜有效打孔，探针未进入核内反应。针对此情况可用延长通透时间等手段加强通透，或尝试下列措施：将固定与通透两步合并进行，即在适量 4%多聚甲醛溶液中加入 0.5%的 Triton X-100，室温孵育 30 min 后，加入 1X PBS 清洗细胞 5 min，3 次，后继续进行“3. 探针检测”步骤。
- 2) 实验过程出现过干片的情况（多数 FISH 或免疫荧光等检测结果无特异信号或背景混乱等的主要原因之一）。
- 3) 未使用对应的 SSC 杂交液充分洗涤。注意洗涤过程要使用指定 SSC 杂交液，不可替换为其它溶液，注

意使用前需预热到洗涤所需温度，并用足量的杂交洗液进行清洗。

5. 检测结果有很多杂质信号是什么情况？

答：主要可能原因如下：

- 1) 实验过程出现过干片的情况（多数 FISH 或免疫荧光等检测结果无特异信号或背景混乱等的主要原因之一）。
- 2) PBS 等试剂未过滤去除杂质或结晶等。
- 3) 爬片本身不干净，或培养过程中产生了较多细胞碎片等未洗去。

6. 环状 RNA 是否可以设计 Ribo™ lncRNA FISH Probe Mix 探针？

答：一般环状 RNA 只有于拼接处才能设计特异性 FISH 探针，需提供序列给锐博分析该处序列组成是否符合设计探针的要求。

7. Ribo™ lncRNA FISH Probe Mix 是否可以使用其它荧光标记？

答：目前均只使用 Cy3 标记。

8. SSC 配方是什么？

答：175.3 g NaCl 和 88.2 g 柠檬酸钠用超纯水溶解定溶为 pH 7.0 的 1 L 溶液即为 20 X SSC 母液，再按体积比用超纯水稀释为对应浓度的 SSC 即可。