

细胞 RNA 荧光原位杂交实验

Protocol of RNA-fluorescence in situ Hybridization (RNA-FISH) for in vitro Culturing Cells

朱林^{1, #}, 王会丽^{2, #}, 王栋^{3, 4, *}

¹ 生命科学学院, 清华大学, 北京 100084, 中国; ² 医学院, 清华大学, 北京 100084, 中国; ³ 合成与系统生物学中心, 清华大学, 北京 100084, 中国; ⁴ 基础医学院, 成都中医药大学, 成都, 611137, 中国

*通讯作者邮箱: dwang@cdutcm.edu.cn

#共同第一作者

引用格式: 朱林, 王会丽, 王栋. (2021). 细胞 RNA 荧光原位杂交实验. *Bio-101* e1010810. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010810.

How to cite: Zhu, L., Wang, H. L. and Wang, D. (2021). Protocol of RNA-fluorescence in situ Hybridization (RNA-FISH) for in vitro Culturing Cells. *Bio-101* e1010810. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010810. (in Chinese)

摘要: 细胞 RNA 荧光原位杂交实验 (RNA-FISH) 是用于研究 RNA 在细胞中定位和水平的方法 (Urbanek and Krzyzosiak, 2016)。该方法利用带有荧光标记的与靶标 RNA 互补的 DNA 探针与细胞内的靶标 RNA 分子杂交, 通过在共聚焦显微镜下观察荧光信号的强度和分布位置, 来确定靶标 RNA 在细胞中的丰度和定位 (Kishi *et al.*, 2019)。和以往采用的放射性同位素标记探针法相比, 改用荧光标记探针的细胞 RNA-FISH 技术具有实验周期短、安全无污染、探针稳定性好、灵敏度高、经济实惠、可用多种颜色在同一细胞中区分多个靶标等优点。本文介绍了细胞 RNA-FISH 实验的具体操作流程及注意事项。

研究背景:

细胞 RNA-FISH 是研究目的 RNA 在细胞中定位的技术, 其依据的实验原理是碱基互补配对原则, 用带有荧光基团标记的探针去结合细胞中的靶标 RNA, 最后使用共聚焦显微镜观察荧光信号来确定目的 RNA 在细胞中的分布。RNA-FISH 技术为研究 RNA 的功能

提供了有力的科研工具，在基因诊断、肿瘤遗传学、病毒感染分析等方面发挥了重要的作用 (Cui *et al.*, 2016)。

材料与试剂

1. 12 孔细胞培养皿 (Thermo Fisher, catalog number: 150628)
2. 胰酶 (Thermo Fisher, catalog number: 25200072)
3. 移液器枪头 (Axygen, catalog number: T-200-Y)
4. 载玻片 (CITOTEST, catalog number: 188105W)
5. 细胞培养皿盖玻片 (Thermo Fisher, catalog number: H18200)
6. 封口膜 (Parafilm, catalog number: PM996)
7. 1× PBS 缓冲液 (Hyclone, catalog number: SH30256.01)
8. 70% 乙醇 (VWR International, catalog number: BDH1164-4LP)
9. 靶向目标 RNA 的探针 (奥科生物技术有限公司)
10. 37%甲醛 (Richard-Allan Scientific, catalog number: 9311)
11. 20 × SSC 溶液 (Ambion, catalog number: AM9765)
12. 甲酰胺 (Ambion, catalog number: AM9342)
13. 硫酸葡聚糖 (Amresco, catalog number: 0198)
14. 封片液 (Invitrogen, catalog number: P36961)
15. DAPI (Invitrogen, catalog number: D1306)
16. 固定液 (见溶液配方)
17. 洗涤缓冲液 (见溶液配方)
18. 杂交液 (见溶液配方)

仪器设备

1. 移液器 (Eppendorf, catalog number: 3120000070)
2. 摇床 (其林贝尔, catalog number: TS-1)
3. 4 °C 冰箱 (海尔)
4. 37 °C 培养箱 (上海一恒, catalog number: LRH-70F)
5. 共聚焦显微镜 (奥林巴斯, catalog number: FV500)

实验步骤

一、探针设计和合成

本文通过网页进行探针设计 (<https://www.biosearchtech.com/stellaris-designer>)。输入序列即可进行探针设计，可以根据需求设计出多条探针。探针的特异性主要通过比对进行验证，在 NCBI 上对设计出来的探针进行逐条比对，若某一条探针靶向到非靶标区域，则进行排除。本文中，针对 LINC00973 共设计 10 条探针，序列见表 1 (Wang *et al.*, 2021)。将设计好的探针送去奥科生物技术有限公司进行合成，3' 端加 ROX 修饰。探针以干粉状态进行合成，合成后稀释成 100 μM，于 -20 °C 冰箱避光保存。

表 1. 靶向 LINC00973 设计的 RNA FISH 探针(Wang *et al.*, 2021).

| 探针编号 | 探针序列 (5' - 3') |
|---------|----------------------|
| Probe1 | AGTCATGAGCAGTTAGTGTC |
| Probe2 | CATTACTGCAGCCAGAGATC |
| Probe3 | GAAGTCGTGCCTAGCAAATG |
| Probe4 | AGACCAGGAAGCCTTCAATT |
| Probe5 | AAGCTGGTACTCGAAGTCAC |
| Probe6 | TGCATGCTAATGTATGCCAA |
| Probe7 | GTATGCAAGGCCATTGATAA |
| Probe8 | GAATGAGTATGAGTGGTTGT |
| Probe9 | CTTTATGCCTGTAGCTGGG |
| Probe10 | TGGAGAAGACCTCTAAATCT |

二、RNA FISH 实验操作步骤

1. 将一块干净的盖玻片置于 12 孔板细胞培养皿底部正中央，然后在该孔中铺上细胞进行培养。
2. 待细胞的密度达到 70%左右时，移除培养基，用 1 ml 1× PBS 洗涤细胞两次去除死细胞。然后加入 1 ml 固定液，在室温下固定 10 min。
3. 移除固定液，用 1 ml 1× PBS 洗涤细胞两次，每次 5 min。加入 1 ml 70%乙醇溶液覆盖细胞，放于 4 °C 冰箱过夜通透。
4. 移除 70%乙醇溶液，加入 1 ml 洗涤缓冲液，将 12 孔板置于摇床上，在室温、60

rpm 条件下晃动洗涤两次，每次 5 min。

5. 取一个空的 200 μ l 枪头盒，枪头架上放一张干净的封口膜，将 50 μ l 加有探针（探针终浓度为 125 nM）的杂交液点在封口膜上，然后把盖玻片带有细胞的一面倒扣在杂交液上，使得有细胞的一面直接接触到杂交液。同时在枪头盒里倒入 20 ml 2 \times SSC 溶液维持枪头盒中的湿度，防止探针溶液挥发。将枪头盒用封口膜封上，放于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中避光过夜孵育。

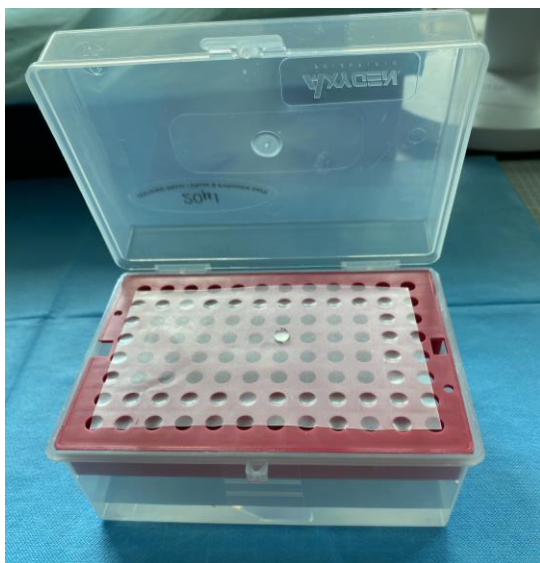


图 1 孵育探针的枪头盒（盒底装有液体，保持湿度，膜上点上探针液，用于细胞孵育）。

6. 孵育完成后，用镊子将盖玻片小心揭起，转移到装有 1 ml 洗涤缓冲液的 12 孔板中，注意让带有细胞的一面朝上，避光孵育 30 min。
7. 移除洗涤缓冲液，加入 1 ml 含 DAPI（终浓度为 5 ng/ml）的洗涤缓冲液对细胞核进行染色，避光孵育 30 min。吸去洗涤缓冲液，加入 1 ml 2 \times SSC 溶液，避光孵育 10 min。
8. 取一块干净的载玻片，点上少量封片液，然后用镊子轻轻夹起盖玻片，小心去除残存液体，将盖玻片带有细胞的一面倒扣在封片液上。
9. 待完成封片后，室温条件下暗处放置 1 h 使其自然干燥，最后在共聚焦显微镜下进行成像分析。

结果分析

以实验室已发表文章数据为例。本实验的目的是为了探究 lncRNA LINC00973 在乳腺癌细胞 MDA-MB-231-LM2 中的定位。我们对 LINC00973 进行过表达，过表达效率如图 2A 所示，野生型和过表达细胞的 RNA FISH 结果如图 2B。绿色为 LM2 细胞本身带的 GFP 蛋白，DAPI 显示的是细胞核，红色为 LINC00973。我们可以看到，红色信号（LINC00973）主要分布在绿色信号（GFP 蛋白，可以代表细胞质的位置）的区域，而不是位于蓝色信号（DAPI，标记细胞核位置）的区域内，说明 LINC00973 在 MDA-MB-231-LM2 细胞中分布在细胞质中。在过表达 LINC00973 的 LM2 细胞中，红色信号增强且依然位于细胞质中，证明靶向 LINC00973 所设计的探针具有良好的特异性。

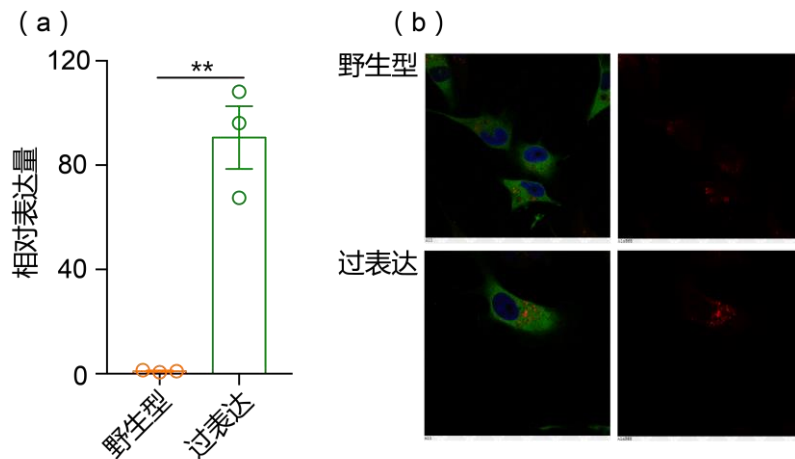


图 2. RNA-FISH 证实 LINC00973 定位于细胞质中 (Wang *et al.*, 2021).

注意事项

1. 操作过程中要防止盖玻片有细胞一面出现干燥情况。
2. 盖玻片有细胞一面倒扣在杂交液上时，不要有气泡。
3. 在设计探针时，若某条探针虽未完全匹配非靶标基因，但大部分区域匹配到了非靶标基因（比如一条 20 个碱基的探针，其中 15 个碱基可以靶向非靶标基因），需要进行进一步判断。若可选择探针较多，则舍弃该探针；若可选择探针不多，则要分析该探针靶向的非靶标基因的表达情况：若非靶标基因表达较高，建议舍弃；若非靶标基因在细胞中表达很低，则可以选用。
4. 为了避免荧光淬灭，所有带荧光的试剂和样品在操作时（包括孵育、洗涤、镜检等

步骤) 最好在暗处进行, 减少在光下暴露的时间。

5. 探针所带荧光基团应根据具体实验要求来进行选择。例如: 如果所用细胞本身带有 RFP, 则不能选用与 RFP 具有同样激发光的荧光基团。

Q&A

1. 杂交结果发现很多背景信号如何优化?

答: (1) 适当延长探针杂交后的洗片时间, 要用新鲜配制的洗涤缓冲液。(2) 适当减少探针的使用量。

2. 拍摄结果荧光信号弱的原因及改进方法

答: 可能原因以及改进方案如下: (1) 探针的灵敏度差低, 建议针对同一个靶 RNA 设计多个探针, 也可以适当增加探针使用量。(2) 荧光试剂过期或探针杂交后的样品长时间接触强光导致荧光淬灭, 建议试剂现配现用, 杂交完成后的样品要注意避光存放。

溶液配制

1. 固定液

1× PBS

3.7% 甲醛

2. 洗涤缓冲液

2× SSC

10% 甲酰胺

3. 杂交液

2× SSC

100 mg/ml 硫酸葡聚糖

10% 甲酰胺

参考文献

1. Cui, C., Shu, W. and Li, P. (2016). [Fluorescence In situ Hybridization: Cell-Based Genetic Diagnostic and Research Applications](#). *Front Cell Dev Biol* 4: 89.
2. Kishi, J. Y., Lapan, S. W., Beliveau, B. J., West, E. R., Zhu, A., Sasaki, H. M., Saka, S. K., Wang, Y., Cepko, C. L. and Yin, P. (2019). [SABER amplifies FISH](#):

- [enhanced multiplexed imaging of RNA and DNA in cells and tissues.](#) *Nat Methods* 16(6): 533-544.
3. Urbanek, M. O. and Krzyzosiak, W. J. (2016). [RNA FISH for detecting expanded repeats in human diseases.](#) *Methods* 98: 115-123.
 4. Wang, H., Lin, K., Zhu, L., Zhang, S. and Wang, D. (2021). [Oncogenic lncRNA LINC00973 promotes warburg effect by enhancing LDHA enzyme activity.](#) *Science Bulletin* 66(4).