

细菌 DNA CARD-FISH 检测试剂盒

产品编号：D-0017 规格：50T

应用范围

探针：HRP-标记的细菌探针

标本：浮游生物，沉积物或沉渣或污泥，土壤等细菌菌群的鉴定。

试剂盒组成

试剂	规格	数量	储存
Solution A	15 ml	1	4℃
Solution B	15 ml	1	4℃
Hybridization Buffer (25%)	10ml	1	-20℃
Hybridization Buffer (35%)	10ml	1	-20℃
Hybridization Buffer (45%)	10ml	1	-20℃
Washing Buffer (10×)	100 ml	2	4℃
TSA-488	50 μl	1	-20℃避光
TSA amplification Buffer	5 ml	1	4℃
DAPI-Antifade Solution	1 ml	1	-20℃避光

注意：

1. Washing Buffer I (10×)，稀释前必须摇匀，摇匀后呈浑浊白色液态，稀释后变澄清，且有少量泡沫；
2. DAPI-Antifade Solution 必须避光储存。

需要自备的试剂、耗材与仪器

细菌探针； 96%乙醇； Rubber Cement； 0.1% DEPC 水； PBS pH7.0 (DEPC 水配制)；
盖玻片； 染缸； 镊子； 0.2ml 离心管； 避光湿盒； 恒温箱； 水浴锅； 荧光显微镜

实验步骤

Day 1

1. 预处理

固定晾干后的浮游生物, 沉积物或沉渣或污泥, 土壤等标本, 72℃烤片 2 小时, 浸入 1×PBS, 5min/次, 2 次

2. 通透

将 solution A 滴加于制备好的标本上, 室温 90min;

用蒸馏水浸洗标本, 室温, 5min/次, 3 次;

3. 内源性过氧化物酶灭活

针对浮游生物标本: 将 Solution B 滴加在标本上, 室温孵育 2-5min; 用蒸馏水冲洗; 再用 96% 乙醇洗涤, 室温 2min; 自然晾干。

注意: 如果标本自带荧光, 需增加孵育步骤: 用 3% H_2O_2 室温孵育 10min。

针对沉淀物或污泥: 用 Solution B, 室温孵育 30-60 秒; 1×PBS 溶液中浸洗 2min; 在 3% H_2O_2 (in MQ Water) 孵育 10min; 用蒸馏水冲洗; 再用 96%乙醇洗涤, 室温 2min; 自然晾干。

4. 杂交

将探针与 Hybridization Buffer 按 1:50~200 稀释, 吹打混合均匀。滴加 15~30 μ l 混匀后的探针, 盖上盖玻片, 用 Rubber Cement 封片, 37℃~42℃杂交 16-72 小时;

注: 本试剂盒配备了 3 种浓度的细菌杂交液, 具体哪种杂交液适合需要客户自行摸索, 不同的样本需要的杂交液浓度不同。

Day 2

以下步骤注意避光操作

5. 洗涤

Washing Buffer (10×) 与蒸馏水按 1: 9 混合均匀, 配成工作液, 揭去 Rubber Cement, 将玻片放入 Washing Buffer 工作液, 3-5min 后, 盖玻片会自动脱落, 再将玻片移至新的 Washing Buffer 工作液 (预热至 42℃), 洗涤 10min;

6. 将玻片移置 1×PBS 溶液中室温洗涤 15min;

以下步骤注意避光

7. 准备新鲜配制 0.15% H_2O_2 (in PBS), 预冷。

8. 配置 TSA 工作液

以 TSA : TSA amplification Buffer : 0.15% H_2O_2 = 1: (50~100) : 1 的比例混合均匀, 静置 2~3 min;

9. 往标本上滴加 50~100 μ l 配置好的 TSA 工作液, 将标本放平于湿盒中 42℃避光孵育 45-60min;

10. $1\times$ PBS 溶液中避光洗涤 5-10min/次;

11. 超纯水中浸洗 5-10min;再将标本浸入 96%无水乙醇 1-2min/次, 2 次; 自然晾干。

注意: 为了确保结果的低背景, 可以适当延长标本在水中和乙醇中的洗涤时间。

12. DAPI- Antifade Solution 封片, 置于暗处反应 20min, 显微镜观察结果; DAPI 呈蓝色荧光 ($A_{max}=358, E_{max}=461$), 探针信号呈绿色荧光 ($A_{max}=496, E_{max}=524$)。

注意事项

- 1) 实验过程中部分试剂对人体有害, 请注意穿戴实验服和配戴手套;
- 2) 冬季室温温度较低, 可适当延长反应时间或置恒温箱中反应;
- 3) 滴加于标本上的试剂应覆盖整个标本, 防止因试剂孵育不全而引起结果的偏差 (可在滴加试剂后加盖盖玻片或封口膜)。
- 4) 本产品只供实验研究使用, 不能应用于临床诊断或治疗。

广州市外显子生物技术有限公司

广州市海珠区敦和路 189 号留学人员创业基地 1 栋 308 室

技术支持: focobiolab@126.com Tel: 86-020-89269730

订购产品: focobio@126.com; Tel: 86-020-89895006