

细胞标本 FISH 预处理试剂盒

产品编号：D-0014 规格：50T

应用范围

标本：一般的细胞爬片、血涂片、中期染色体滴片；

探针：直接荧光标记的 DNA FISH 探针。

试剂盒组成

试剂	规格	数量	储存
DNA 变性液	100ml	2	4℃
Washing Buffer (10×)	100ml	2	4℃
蛋白酶消化液	50ml	2	4℃
DAPI-抗荧光淬灭封片剂	1ml	1	-20℃
Rubber cement 橡胶胶水	118ml	1	4℃
玻片盒	5 片装	2	RT

注意

- 标本变性时，建议用试剂盒配套的玻片盒，每次加 20ml 左右的 DNA 变性液，使用后用干净的瓶子收集 DNA 变性液，4℃ 储存，不超过一个月，DNA 变性液可重复使用 4~5 次。
- Washing Buffer 稀释前应摇匀，摇匀后呈浑浊白色液态，用纯水稀释，稀释后变澄清，且有少量泡沫。

需要自备的试剂、耗材与仪器

- 试剂：探针；1%多聚甲醛，100%、85%、70% 的乙醇；
- 耗材：0.2ml PCR 管、22×22mm 盖玻片
- 仪器：烘箱、微量移液器、水浴锅、PCR 仪、原位杂交仪（可选）

实验步骤

固定

细胞爬片、涂片

- 已固定细胞片子，滴加蛋白酶消化液（完全覆盖检测区域），37℃ 消化 10-15min
- PBS 洗涤 5min，浸入 1%多聚甲醛固定 5min，
- PBS 洗涤 5min，依次过 70%、85%、100%乙醇各 2min，晾干，进行后续变性、杂交。

中期染色体滴片

常规制片后，85℃烘箱烤 30min，进行杂交、变性。长期不用的滴片，-20℃干燥储存。

变性、杂交

☛方法一(玻片与探针分开变性):

I.玻片变性

① 将 18~20ml 变性液倒入玻片盒，变性液在水浴锅里加热至 $77 \pm 2^\circ\text{C}$ ，将玻片轻轻放入玻片盒中，将玻片浸入变性液 4~8 分钟。

② 梯度脱水：马上置入冰冷 70%乙醇 3min，然后 85%、100%无水乙醇脱水，各 2min，空气晾干

注意：

- a. 变性后脱水的 100%、85%、70% 的乙醇，需在 -20°C 冰箱预冷 30min 以上；
- b. 标本必需完全干燥，才能加探针；

II. 探针变性（以下步骤，探针注意避光）

① 取实验所需的探针量（按每个标本 10 μl 计），加入到 0.2ml PCR 管中，PCR 仪中 85°C 变性 5min， 37°C 平衡 2min；

② 将探针加在完全干燥的玻片上，加盖玻片（22 \times 22mm）；Rubber Cement 胶封片。放入湿盒中。

③ $37\sim 42^\circ\text{C}$ 杂交过夜（16~36 小时）。

☛方法二（玻片探针共变性）：

将探针加到玻片组织位点，加盖玻片，Rubber Cement 胶封片，杂交仪 80°C ，变性 5min， $37\sim 42^\circ\text{C}$ 杂交过夜（16~36 小时）。

玻片洗涤

Washing Buffer（10 \times ）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（提前预热至 72°C ），洗涤 2min，再移到室温的 Washing Buffer 工作液，洗涤 5min。

观察结果

② 20 μl 滴加 DAPI-抗荧光淬灭封片剂，加盖玻片，置于暗处 15min。

② 荧光显微镜观察结果（先 10 或 20 倍镜下观察 DAPI，然后 100 倍油镜下观察）。

注：镜下观察需要考虑滤光片和显微镜调节，请仔细观察；如果不能及时观察结果，请将标本置于标本盒，用锡纸包好， -20°C 冰箱放置，此方法储存的标本的荧光信号大概能保留 2 个月以上。

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 2 号楼 404-405

技术支持：QQ 2251645850 订购：QQ 1050304988

咨询：E-mail: focobio@126.com; exonlab@qq.com; Tel: 86-020-89895006