

组织细菌 DNA CARD-FISH 检测试剂盒

产品编号：D-0018 规格：50T

应用范围

探针：HRP-标记的细菌探针

标本：石蜡包埋组织细菌菌群的鉴定。

试剂盒组成

试剂	规格	数量	储存
Solution A	10 ml	1	RT
Solution B	10 ml	1	RT
Solution C	50 μ l	1	-20 $^{\circ}$ C
Solution D	500ml	1	RT
Hybridization Buffer (25%)	10 ml	1	-20 $^{\circ}$ C
Hybridization Buffer (35%)	10 ml	1	-20 $^{\circ}$ C
Hybridization Buffer (45%)	10 ml	1	-20 $^{\circ}$ C
Washing Buffer (10 \times)	100 ml	2	4 $^{\circ}$ C
TSA-488	50 μ l	1	-20 $^{\circ}$ C 避光
TSA amplification Buffer	5 ml	1	4 $^{\circ}$ C
DAPI-Antifade Solution	1 ml	1	-20 $^{\circ}$ C 避光

注意：

1. Washing Buffer I (10 \times)，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；二甲苯或其替代品；100%、85%、70%乙醇；4%多聚甲醛；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

石蜡组织切片

72°C 烤片 2 小时，二甲苯脱蜡，5min/次，3 次；无水乙醇、85%乙醇、70%乙醇依次 5min；

浸入 PBS，5min/次，1 次

2. 通透

将 solution A 滴加在标本上室温孵育 12min；

3. 内源性过氧化物酶灭活

将 Solution B 与蒸馏水按 1: 50 稀释，混合均匀后，工作液滴加在标本上，室温孵育 10-20min；

将 Solution C 与 Solution D 按照 1:40,000 稀释，混合均匀后，工作液滴加在标本上，37°C 孵育

5min；

将 Solution B 工作液滴加在标本上，室温孵育 10min；用蒸馏水冲洗，空气自然晾干；

4. 准备探针

将探针与 Hybridization Buffer 按 1:50~200 稀释，混合均匀后，88°C 变性 3min，37°C 平衡 5min；

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。

5. 杂交

封闭结束后，吸取 Blocking Buffer，滴加 15~30 μ l 平衡后的探针，盖上盖玻片，用 Rubber Cement 封片，放置在湿盒中 37°C~42°C 杂交 16-72 小时；

Day 2

以下步骤注意避光操作

6. 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（预热至 42°C），洗涤 10min；

7. 将玻片移置 1 \times PBS 溶液室温摇动洗涤 15min（可将装有 PBS 溶液的洗缸放在摇床上洗涤）；

以下步骤注意避光

8.准备新鲜配制 0.15% H_2O_2 (in PBS), 预冷。

9. 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;

10. 往标本上滴加 50~100 μ l 配置好的 TSA 工作液, 将标本平放于湿盒中 42 $^{\circ}$ C 避光孵育 45-60min;

11. 1 \times PBS 溶液中室温避光洗涤 5-10min/次;

12. 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。

18. 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 (Amax =358, Emax =461), 探针信号呈绿色荧光 (Amax =496, Emax =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