

石蜡预处理试剂盒II

产品编号：D-0003 规格：50 T

应用范围

M-FISH, 难处理的样本（如前列腺组织石蜡样本等）

试剂盒组成

试剂	规格	数量	储存
预处理液（50×）	100ml	1	RT
蛋白酶消化液	200 ul	3	4℃
蛋白酶缓冲液	50 ml	2	4℃
变性液	50ml	3	4℃
10×洗液	100ml	1	RT
DAPI-Antifade Solution	1ml	1	-20℃, 避光
玻片盒	5片/盒	2	

注意：

- 10×洗液稀释前必须摇匀，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；
- 蛋白消化液配制 按 蛋白消化酶：消化缓冲液 = 10 μl：1ml 比例均匀混合，现配现用。
- 变性液体可以连续用3次，不超过1个月，洗涤液使用前用纯水稀释，用完放置2~8℃。

需要自备的试剂、耗材与仪器

探针、杂交液；.PBS (pH7.0)；二甲苯替代品；100%、85%、75% 的乙醇；Rubber cement 胶；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

- **标本预处理:**

1. 老化: 准备 4~10 μ m 厚度的石蜡切片, 烤片, 65 $^{\circ}$ C 过夜或 70 $^{\circ}$ C、2 小时以上。
2. 脱蜡: 浸入二甲苯替代物, 每缸 5 分钟, 共 3 次。
3. 脱水: 然后 100% 酒精浸泡 5 分钟, 晾干。
4. 预处理: 将预处理液用蒸馏水稀释至 1 \times , 微波中火 10 分钟煮沸。
5. 将片子放入已煮沸的预处理液 (100 \pm 5 $^{\circ}$ C) 中, 煮 25 分钟。
6. 冲洗: 用 PBS 浸泡, 每缸 5 分钟, 共 2 次。

- **蛋白消化:**

6. **蛋白消化液:** 将足量消化液滴加在玻片上, 37~45 $^{\circ}$ C, 10-20 分钟, 根据组织情况调整消化时间。观察消化情况, 关键步骤。
7. PBS 浸泡 2 次, 每次 5 分钟。
8. 75%、85%、100% 酒精脱水各 1 分钟。
9. 空气晾干。

- **FISH**

- 方法一:**

- 玻片变性

11. 用水浴锅将变性液预热, 77 \pm 2 $^{\circ}$ C, 10 分钟。
(注意: 水浴锅升温至 77 $^{\circ}$ C 时开始计时; 可用附赠的玻片盒加热)
12. 将玻片浸入已预热变性液中, 77 \pm 2 $^{\circ}$ C, 4~6 分钟。
13. 梯度脱水: 马上置入冰冷 70% 酒精 3 分钟, 然后 85%、100% 酒精脱水, 各 1 分钟。在 45~50 $^{\circ}$ C 预热备用。

- 探针变性, 以下步骤, 探针注意避光。

1. 77 $^{\circ}$ C 变性 5 分钟, 冰上放置, 然后 37 $^{\circ}$ C 平衡 2 分钟备用, 建议用 PCR 仪。
2. 将探针加在完全干燥的玻片上。
3. 加盖玻片, Rubber cement 胶封片; 37~42 $^{\circ}$ C 过夜 (16~36 小时)。

- 方法二:**

- 玻片探针共变性

将探针加到玻片标本位点, 盖上 22 \times 22mm 盖玻片, Rubber cement 胶封片, 设置仪器 85 $^{\circ}$ C, 变性 5~8 分钟, 转到孵育盒 37 $^{\circ}$ C 孵育 16~24 小时。

- **玻片洗涤:**

1. 准备 2 缸洗液工作液 (用蒸馏水将 10 \times 洗液稀释 10 倍, 成为洗液工作液)。

1. 缸置于 72℃，至少 30 分钟。
2. 轻轻揭去玻片上的胶，如果不好揭开以及为避免干燥，可以先放在常温洗液里面。
3. 72℃缸，洗涤 2 分钟；常温缸，洗涤 2 分钟。
4. 梯度脱水，75%、85%、100%酒精，1 分钟。空气干燥。

• **观察结果：**

1. 滴加 20μl DAPI-Antifade Solution，加盖玻片。
2. 置于暗处 15 分钟，显微镜观察结果。
3. 结果，镜下观察需要考虑滤光片和显微镜调节，请仔细观察。

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 栋 404-405 室
技术支持：QQ 2251645850 订购：QQ 1050304988
咨询：E-mail: focobio@126.com; exonlab@qq.com; Tel: 86-020-89895006