

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°C
Washing Buffer (10×)	100ml	2	4°C
蛋白酶消化液	50ml	2	4°C
DAPI-抗荧光淬灭封片剂	1ml	1	-20°C
FISH 封片胶	25ml	2	4°C
玻片盒	5 片装	2	RT

注意

1. 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°C 储存, 不超过一个月, DNA 变性液可重复使用 4~5 次。
2. 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

1. 已固定细胞片子, 滴加蛋白酶消化液 (完全覆盖检测区域), 37°C 消化 10-15min
2. PBS 洗涤 5min, 浸入 1%多聚甲醛固定 5min,
3. 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°C 烘箱烤 30min, 进行杂交、变性。长期不用的滴片, -20°C 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℃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）；FISH 封片胶封片。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，FISH 封片胶封片，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

①滴加 20 μl 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℃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