



GenePharma---a siRNA company

Shanghai GenePharma Co.,Ltd

荧光原位杂交（FISH）试剂盒 说明书

荧光原位杂交（FISH）试剂盒说明书

一、 检测原理

荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization), 简称为 FISH, 是一种重要的非放射性原位杂交技术。它的基本原理是: 用已知的荧光素标记单链核酸为探针, 按照碱基互补配对原则, 与待检测的染色体或 DNA 纤维切片上的靶 DNA 特异结合, 二者经变性-退火-复性, 即可形成靶 DNA 与核酸探针的杂交体。随后在荧光显微镜下对待测 DNA 进行定性、定量或相对定位分析。

二、 组分和保存条件

成分	容量 (50 tests)	储存
枸橼酸缓冲液	10ml	室温
20×SSC	10ml	室温
蛋白酶 K	20ul	-20℃
杂交缓冲液	8ml	室温
去离子甲酰胺	14ml	室温
DEPC 水	5ml	-20℃
DAPI	25ul	-20℃
目的基因探针	2OD	-20℃
阳性对照探针	2OD	-20℃
阴性对照探针	2OD	-20℃

注意:

1. 20×SSC 用一级纯水稀释成 2×SSC 使用。
2. 去离子甲酰胺在通风橱使用。
3. 蛋白酶 K 用 2×SSC 按照 1:1000 稀释。
4. 探针应避光稀释并保存, 且实验过程中加入探针后的操作应在避光条件下进行。
5. DAPI 用 PBS 按照 1:1000 稀释, 需避光保存和使用。

三、 实验方法

1. 复水:

- 1) 冰冻切片取出, 每张切片滴加 0.1mol 枸橼酸缓冲液 100ul, 室温放置 15min;
- 2) 吸弃 0.1mol 枸橼酸缓冲液, 滴加 PBS100ul 洗两次, 每次 5min;

2. 蛋白酶处理:

- 1) 蛋白酶 K 溶液预热至 37° C;
- 2) 每张切片滴加蛋白酶 K 溶液 100ul, 37° C 孵育 20min;
- 3) 每张切片滴加 2×SSC100ul 在室温下漂洗切片 3 次, 每次 1min;
- 4) 梯度酒精 70%、80%、90%、100% (-20° C 预冷) 脱水, 每次 2min, 空气中干燥。

3. 变性:

- 1) 78 °C 预热变性液;
- 2) 每张切片滴加预热后的变性液 100ul, 孵育 8 min;
- 3) 梯度酒精 70%、80%、90%、100% (-20 °C 预冷) 脱水, 每次 2min, 空气中干燥。

4. 杂交:

- 1) 准备探针, 1OD 探针用 40ul DEPC 水溶解, 避光备用;
- 2) 配制杂交溶液, 例: 70ul 杂交缓冲液, 2ul 探针, 28ul DEPC 水, 终体积为 100ul; (可先做预实验确定所需的探针浓度, 即探针 5 ul -0.6 ul, 杂交缓冲液 70ul, 加 DEPC 水补足至 100ul。设置浓度为 50 ug/ml, 20 ug/ml, 12.5 ug/ml, 6 ug/ml 四个梯度。
- 3) 准备湿盒, 交叉放置切片;
- 4) 滴 100ul 杂交溶液在切片上, 加盖玻片;
- 5) 盖上湿盒盖, 37 °C 孵育 12-16h。

5. 杂交后水洗:

- 1) 43 °C 预热杂交后水洗溶液;
- 2) 镊子小心去除切片上的盖玻片, 每张切片滴加预热的杂交后水洗溶液 100ul 43 °C 洗切片 15min;
- 3) 2×SSC (预热至 37 °C) 洗 2 次, 每次 10min;
- 4) PBS 洗 1 次, 10min。

6. 细胞核染色:

- 1) 每张切片加 10ul DAPI, 覆盖盖玻片并在室温下避光孵育 20min;
- 2) 显微镜下观察, 或置于湿盒中 4 °C 保存。