

# DNA荧光原位杂交 (DNA-FISH) 试剂盒

## Fluorescent In Situ Hybridization for DNA (DNA-FISH) Kit

注:本产品干冰运输;试剂按说明书分别保存于4°C及-20°C,保质期12个月。

序号	试剂	货号及规格			储存
		IFH004 (30T)	IFH004M (50T)	IFH004L (100T)	
01	抗荧光衰减封片剂	0.9 mL	1.5 mL	3 mL	4°C
02	1×TBS	2.4 mL	4 mL	8 mL	4°C
03	去离子甲酰胺	1.2 mL	2 mL	4 mL	4°C
04	蛋白酶 K(2mg/mL)	12 μL	20 μL	40 μL	-20°C
05	杂交液	1.2 mL	2 mL	4 mL	-20°C
06	DAPI	1.2 mL	2 mL	4 mL	-20°C
07	RNase	12 μL	20 μL	40 μL	-20°C
08	封片膜	50张	100张	150张	—

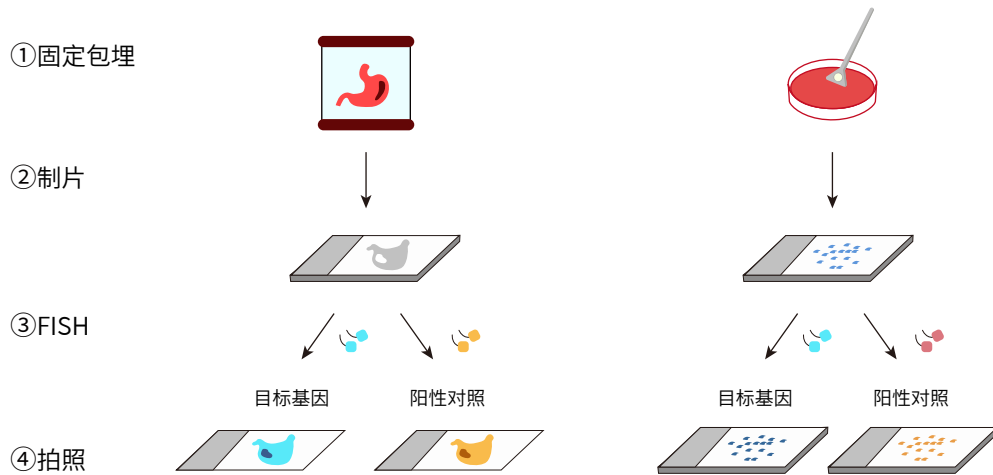
### 产品简介/Product Description

荧光原位杂交 (Fluorescent in situ hybridization, FISH) 是将经荧光素标记的寡核酸探针与变性后的染色体、细胞或组织中的核酸按照碱基互补配对原则进行杂交,再经变性、退火、复性、洗涤后,形成靶 DNA 或 RNA 与核酸探针的杂交体,最后,在荧光显微镜下显影,从而对待测 DNA 或 RNA 进行定性和定位分析。

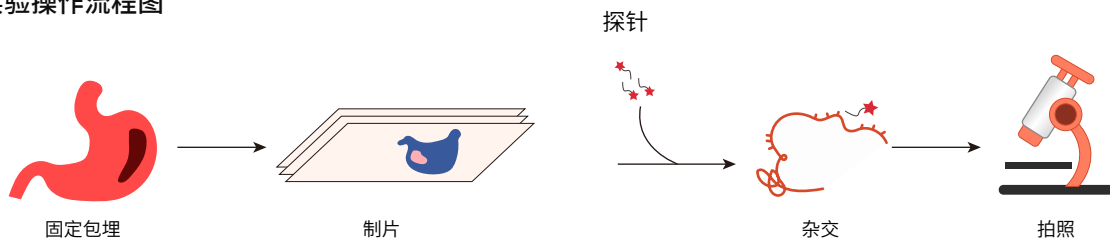
针对目的 DNA 片段设计特异性探针并进行 DNA-FISH,可应用于 DNA 染色体定位、基因拷贝数、染色体结构、转基因分析等。

## 技术路线/Technology mapping

### 1. 原理流程图



### 2. 实验操作流程图



## 使用流程/Procedure

### 1. 样本前处理及制片

#### (1) 石蜡切片 / 组织芯片

①脱蜡：将石蜡切片置于二甲苯中，浸没脱蜡 3 次，每次 5min；

**注意：脱蜡前将切片置于烘片机上，56℃ 烘片 30min，使蜡软化；**

②复水（选做）：切片浸入无水乙醇，室温浸泡 10min；依次经 90%、80%、70% 乙醇梯度复水，每个梯度 3min。

③洗涤：放入去离子水中 95℃ 孵育 30min，取出甩干水分。

#### (2) 冰冻切片

①烘片及固定：从 -80℃ 取出冰冻切片，快速转移至预热的烘片机，56℃ 烘片 30min；切片浸入 4℃ 预冷的 90% 乙醇，室温固定 20min；室温静置干燥。

②复水（选做）：切片浸入无水乙醇，室温浸泡 10min；依次经 90%、80%、70% 乙醇梯度复水，每个梯度 3min；去离子水浸洗切片 1 次，5min。

**注意：固定组织做的冰冻切片需进行步骤（②复水）；新鲜组织的冰切无需进行此步骤。**

#### (3) 细胞爬片

①固定：细胞爬片置于 6 孔板中，加入 4% 多聚甲醛，室温固定 20min；加入 1mL DEPC 水洗涤 2 次，每次 5min。

**注意：可加少量 1×PBS 置于 4℃ 冰箱中短暂保存。**

#### (4) 滴片

①低渗处理：细胞培养汇合度 60%~80% 时，加入适量秋水仙素 (200ng/mL)，37°C处理 2h；胰酶消化细胞至 15 mL 离心管中，室温 1200r/min 离心 5min，去上清，1×PBS 轻轻悬浮清洗细胞沉淀；加入 5-8mL 37°C预热的 KCl 低渗液，轻轻吹打悬浮细胞，37°C孵育 20-40min，期间轻轻吹打 2~3 次。

②固定：缓慢加入 1mL 甲醇 - 冰醋酸固定液（甲醇：冰醋酸 (V/V) =3:1），轻轻吹打悬浮细胞，预固定 3min，室温 200g 离心 5min，去上清；缓慢加入 8 mL 甲醇 - 冰醋酸固定液，轻轻吹打悬浮细胞，固定 40min；离心，轻轻吸去上清，重复固定 40min，室温 200g 离心 5min，去上清，再加入适量固定液，轻轻重悬细胞。

③滴片：移液枪吸取少量细胞悬液，于 20~30cm 的高度，将悬液滴到载玻片上，每张片子 2~3 滴；75°C干燥 3h 左右，待玻片自然冷却至室温后，编号，保存备用。

#### 注意：

1. 低渗处理的细胞悬液置 -20°C冰箱中可保存 1 个月；在此期间可随时取出，离心去上清后加入新鲜固定液；
2. 固定好的细胞需立即滴片，载玻片需事先 -20°C预冷；
3. 建议勿将制好的片子室温干燥下放置过久，易影响信号质量。

#### 2. 杂交

①RNase 处理（选做）：RNase 与 1×TBS 按 1:100 比例配制工作液；每张玻片滴加 20~40μL，37°C孵育 1h；2×SSC 洗涤 1 次，5min；

②老化：0.1%NP-40/2×SSC 浸泡 1 次，30min；

③消化：蛋白酶 K 与 1×TBS 按 1:100 比例配制消化工作液；每张玻片滴加 20~40μL，37°C孵育 10min；依次经 70%、80%、90%、100% 乙醇梯度脱水，每个梯度 5min；

④探针及样本变性：每张玻片滴加 20~40μL 变性液，盖膜 将探针与杂交液按 1:39 比例配制杂交反应液，充分混匀；玻片与杂交反应液置于 75°C热变性 5~8min；

⑤杂交：杂交反应液快速转移至冰上，静置 2~10min；玻片依次经 70%、80%、90%、100% 乙醇梯度脱水，每个梯度 1min，自然风干；滴加 20~40μL 杂交反应液于玻片杂交区，盖膜，快速转移至 37°C杂交过夜 (16h~20h)；

⑥洗涤：53°C预热的 2×SSC 洗涤 1 次，5min；42°C预热的含 0.1%NP-40/2×SSC 洗涤 1 次，5min；42°C预热的 2×SSC 洗涤 1 次，5min；

⑦DAPI 染核：滴加 20~40μL DAPI，盖膜，避光染色 10min；1×PBS 洗涤 2 次，每次 5min，避光晾干；

⑧荧光显微镜观察：滴加 10~30μL 抗荧光衰减封片剂封片；荧光显微镜 / 激光共聚焦拍照，或 -20°C避光暂存。

#### 注意：

1. 玻片、反应液体体系应避免干燥；
2. 杂交液应提前拿出恢复至室温后再使用；
3. 玻片上可设置多个杂交区；
4. 加探针后，所有操作步骤应避光进行；
5. 杂交时间可适当延长至 48h；
6. 0.1%NP-40/2×SSC 洗涤非特异性杂交信号时，也可以洗掉没有杂交上的探针；
7. DAPI 用量视样本大小而定；
8. 封片剂用量视样本大小而定。

#### 注意事项/Notes

1. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内；
2. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

