



GenePharma

GenePharma---a siRNA company

Shanghai GenePharma Co.,Ltd

荧光原位杂交（FISH）试剂盒 说明书



GenePharma

GenePharma---a siRNA company

Shanghai GenePharma Co.,Ltd

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 (100 tests)	储存
杂交缓冲液	14ml	室温
20×SSC	7ml	室温
TritonX-100	50ul	室温
Tween-20	100ul	室温
DEPC 水	10ml	-20℃
DAPI	25ul	-20℃
目的基因探针	2OD	-20℃
阴性对照 NC 探针	2OD	-20℃
阳性对照 β-actin 探针	2OD	-20℃

注意:

1. 20×SSC 用一级纯水稀释成 2×SSC 或 0.4×SSC 使用。
2. 0.1% TritonX-100 用 PBS 配制, 且现用现配。
3. 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。
4. DAPI 用 PBS 按照 1:1000 稀释, 需避光保存和使用。

三、 实验方法

3.1 贴壁细胞 (以 48 孔板为例)

1. 按照 1×10^4 细胞/孔的密度将贴壁细胞接种于 48 孔板 (孔内提前放入已处理好的且大小合适的盖玻片) 中, 混匀后于 37℃ 5% CO₂ 培养箱中培养过夜。
2. 吸弃孔板中的培养基, PBS 洗两次, 每次 5min。
3. 吸弃 PBS, 每孔加入 100ul 无水乙醇, 室温固定 15min。
4. 吸弃无水乙醇, 每孔加入 100ul 0.1% tritonX-100 (现用现配) 室温处理细胞 15min。
5. 吸弃 0.1% tritonX-100, PBS 洗两次, 每次 5min。



GenePharma

GenePharma---a siRNA company

Shanghai GenePharma Co.,Ltd

6. 吸弃 PBS, 每孔加入 100ul 2×SSC, 37℃ 培养箱放置 30min。
7. 吸弃 2×SSC, 每孔加入 100ul 70%乙醇, 室温放置 3min。
8. 吸弃 70%乙醇, 每孔加入 100ul 85%乙醇, 室温放置 3min。
9. 吸弃 85%乙醇, 每孔加入 100ul 无水乙醇, 室温放置 3min。
10. 吸弃无水乙醇, 室温干燥。
11. 杂交缓冲液提前在 37℃ 水浴锅孵育 2h。
12. 1OD 探针用 40ul DEPC 水溶解, 浓度为 1ug/ul, 避光备用。
13. 每孔配制 100 ul 探针混合液, 即探针 5 ul -0.6 ul (可先做预实验确定所需的探针浓度), 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。
14. 73 °C 水浴锅变性 5min。
15. 每孔加入 100ul 探针混合液, 于 37℃ 培养箱孵育过夜。
16. 杂交次日, 将样本从 37℃ 培养箱取出, 吸弃探针混合液, 每孔加入 100ul 于 65℃ 预热的 0.4×SSC/0.3%Tween20 洗涤 2min。
17. 吸弃 0.4×SSC/0.3%Tween20, 每孔加入 100ul 的 2×SSC/0.1%Tween20 100ul, 室温洗涤 2min, 吸弃洗涤液, 于室温干燥。
18. 每孔加入 100ul 稀释后的 DAPI 染液, 避光染色 20min, 吸弃, 加入 100ul PBS, 挑出盖玻片, 于荧光显微镜下观察。

3.2 悬浮细胞

1. 将悬浮细胞固定在玻片上:
 - a) 方法一: 用甩片机使固定于无水乙醇的悬浮细胞贴在玻片 (多聚赖氨酸处理) 上;
 - b) 方法二: 涂片, 将细胞悬液滴在多聚赖氨酸处理过的载玻片上, 另取一片载玻片做推片, 将推片自细胞滴左侧向右移动, 当细胞滴均匀地附着在两片之间时, 再将推片向左平稳地移动 (两片成 30--40 度夹角) 推出均匀的细胞膜, 于酒精灯上过几次烤干。
2. 将烤干的细胞涂片置于 10cm dish 中, 滴加 0.1%tritonX-100 消化 15min。
3. 吸弃 0.1%tritonX-100, 滴加 PBS 洗两次, 每次 5min。



GenePharma

GenePharma---a siRNA company

Shanghai GenePharma Co.,Ltd

4. 吸弃 PBS, 滴加 100ul 2×SSC, 37°C 培养箱放置 30min。
5. 吸弃 2×SSC, 滴加 100ul 70%乙醇, 室温放置 3min。
6. 吸弃 70%乙醇, 滴加 100ul 85%乙醇, 室温放置 3min。
7. 吸弃 85%乙醇, 滴加 100ul 无水乙醇, 室温放置 3min。
8. 吸弃无水乙醇, 室温干燥。
9. 杂交缓冲液提前在 37°C 水浴锅孵育 2h。
10. 1OD 探针用 40ul DEPC 水溶解, 浓度为 1ug/ul, 避光。
11. 每张玻片配制 100 ul 探针混合液, 即探针 5 ul -0.6 ul (可先做预实验确定所需的探针浓度), 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。
12. 73 °C 水浴锅变性 5min。
13. 每张玻片滴加 100ul 探针混合液, 盖上盖玻片置于湿盒中 , 37°C 培养箱孵育过夜。
14. 杂交次日, 将样本从 37°C 培养箱取出, 吸弃探针混合液, 每张玻片滴加 100ul 于 65°C 预热的 0.4×SSC/0.3%Tween20 洗涤 2min。
15. 吸弃 0.4×SSC/0.3%Tween20, 每张玻片滴加 100ul 的 2×SSC/0.1%Tween20 100ul, 室温洗涤 2min, 吸弃洗涤液, 于室温干燥。
16. 每张玻片滴加 100ul 稀释后的 DAPI 染液, 避光染色 20min, 吸弃, 每张玻片滴加 100ul PBS 洗 2 次, 滴加甘油盖上盖玻片, 于荧光显微镜下观察。



GenePharma

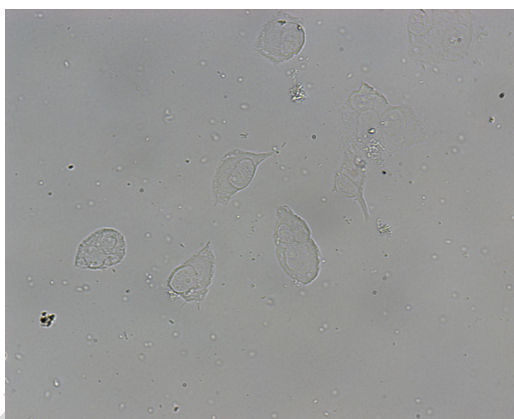
GenePharma---a siRNA company

Shanghai GenePharma Co.,Ltd

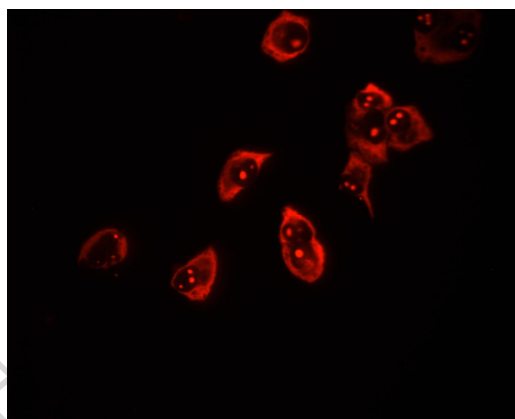
四、 实验案例

4.1 贴壁细胞爬片

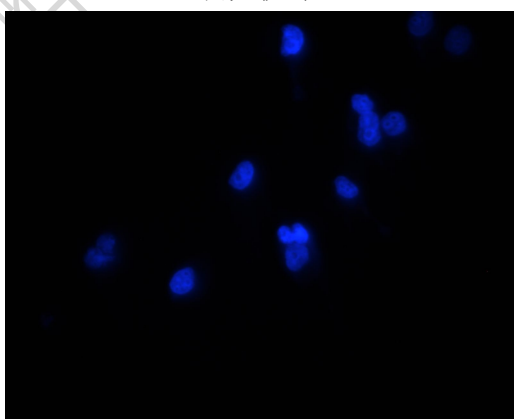
4.1.1 LNCrNA



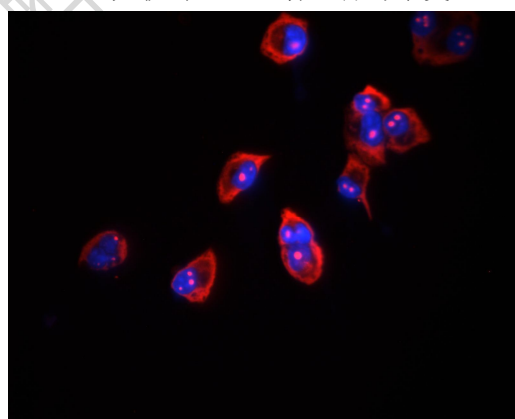
白光视野



红光视野 (CY3 标记探针杂交)

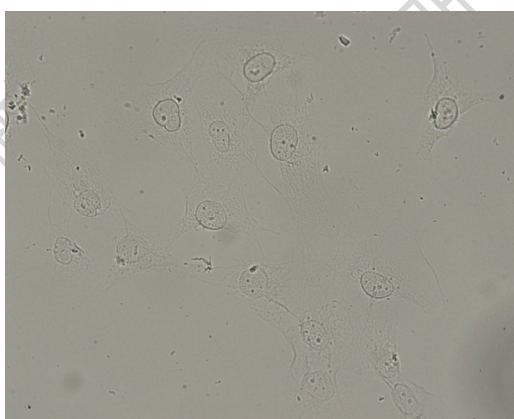


蓝光视野 (DAPI 染核)

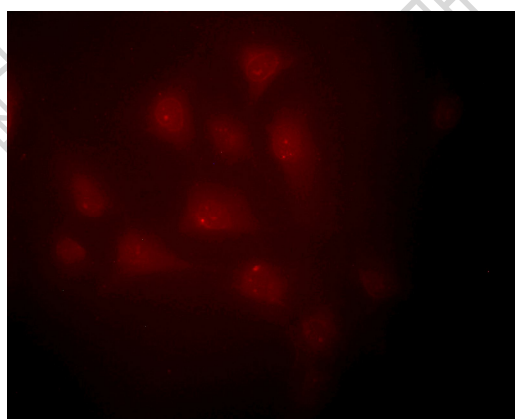


MERGE

4.1.2 MicroRNA



白光视野



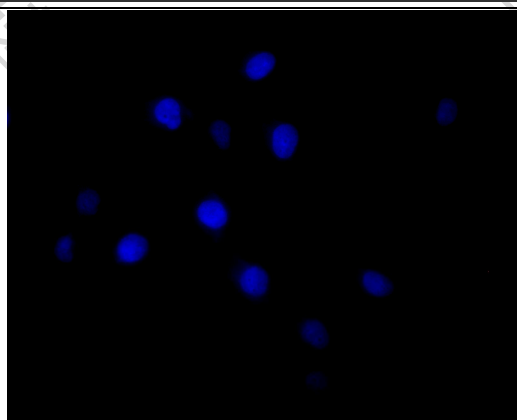
红光视野 (CY3 标记探针杂交)



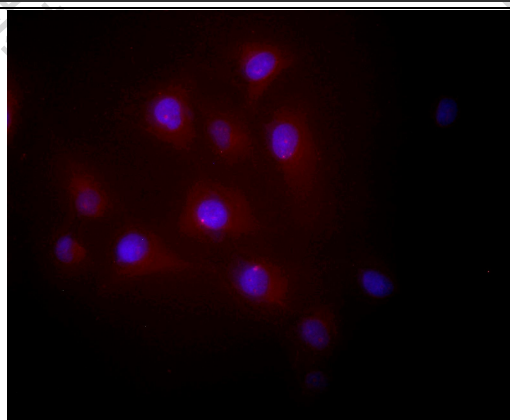
GenePharma

GenePharma---a siRNA company

Shanghai GenePharma Co.,Ltd

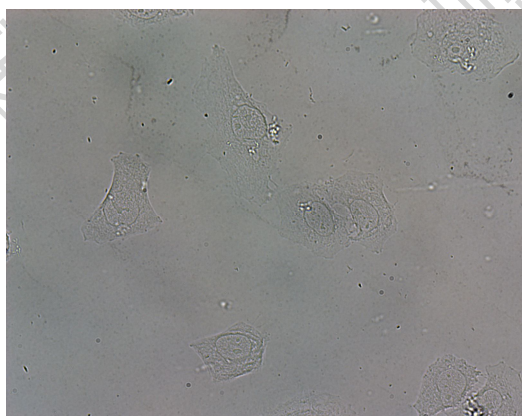


蓝光视野 (DAPI 染核)

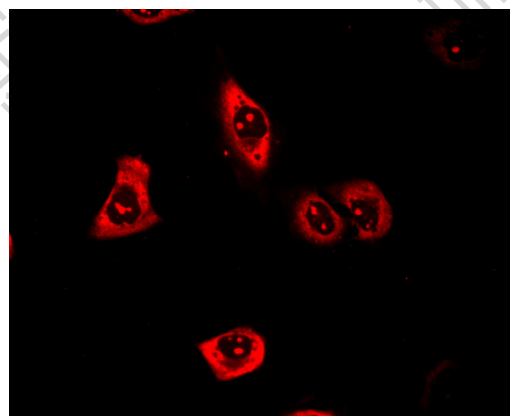


MERGE

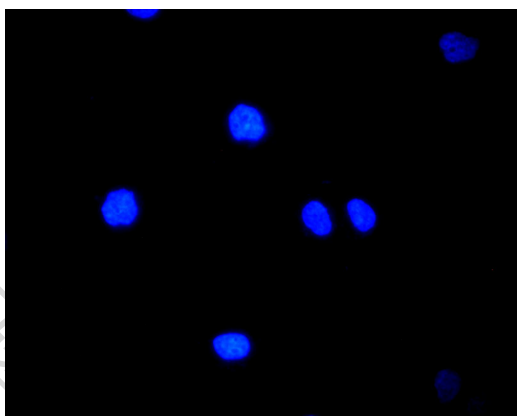
4.1.3 DNA



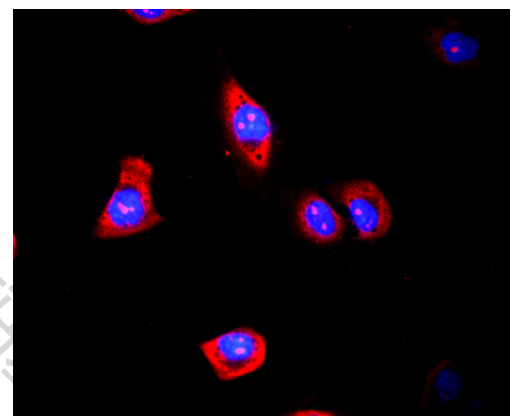
白光视野



红光视野 (CY3 标记探针杂交)



蓝光视野 (DAPI 染核)



MERGE

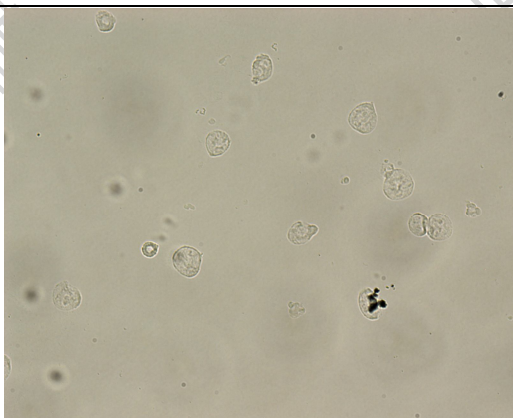
4.1 悬浮细胞烤片



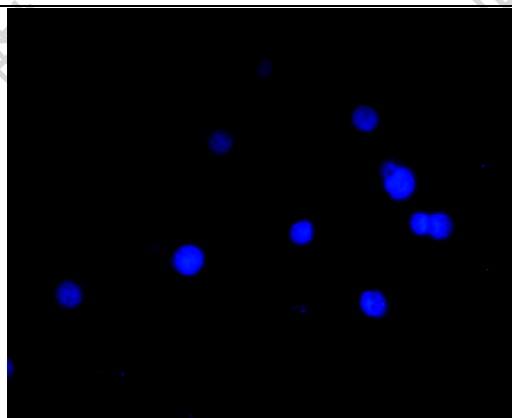
GenePharma

GenePharma---a siRNA company

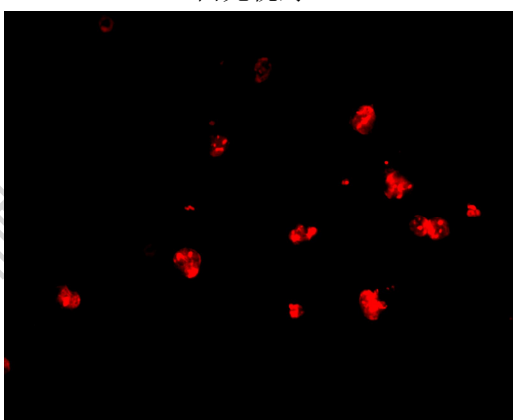
Shanghai GenePharma Co.,Ltd



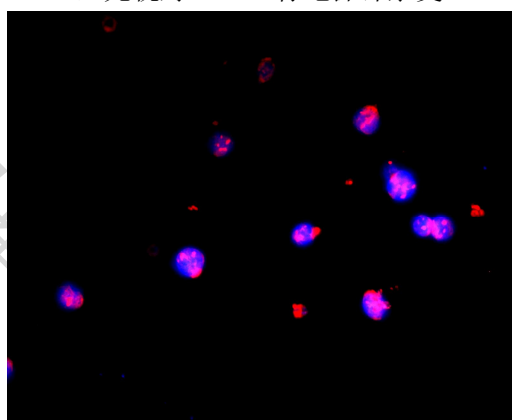
白光视野



红光视野 (CY3 标记探针杂交)



蓝光视野 (DAPI 染核)



MERGE