重复序列 DNA 荧光原位杂交试剂盒（石蜡切片）说明书

如有疑问欢迎垂询
上海电话：021-51320195　　E-mail：support@genepharma.com
苏州电话：0512-86668828　　E-mail：szsupport@genepharma.com
http://www.genepharma.com

B089-V002-20241224

一、 检测原理

DNA 荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization)，简称为 DNA 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 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 进行相对定性、定量或定位分析。

二、 组分和保存条件

成分	容量（50 tests）	储存
Buffer C（20× SSC）	20 mL	室温
Buffer D（去离子甲酰胺）	14 mL	室温
Buffer E（杂交缓冲液）	200 μL	室温
蛋白酶 K	20 μL	-20℃
DEPC 水	6 mL	-20℃
RNase A	1 mL	4℃
DAPI	25 μL	-20℃
抗荧光猝灭剂	300 μL	室温
阳性对照探针	1 OD	-20℃
阴性对照探针	1 OD	-20℃
靶标探针	2 OD	-20℃

三、 试剂配制

1. Buffer C 母液为 20× ，用一级纯水（建议 DEPC 水）稀释成 2× 使用；
2. RNA 酶溶液：向 50 mL 2× Buffer C 中加入 100 μL 1 mg/mL RNase A（终浓度为 2 μg/mL）。
3. 蛋白酶 K 工作液：蛋白酶 K 用 2× Buffer C 按照 1:1000 稀释；
4. DAPI 工作液：用 PBS 按照 1:1000 稀释，需避光保存和使用。

注意：

1. Buffer D 在通风橱使用；
2. 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；
3. 实验过程中常用试剂，如二甲苯、PBS 缓冲液、乙醇等请您自备；
4. 探针配制方法及保存请参考探针使用报告；

5. 以下操作中的反应时间、温度、Buffer 浓度及用量仅供参考，可根据具体情况优化。

四、 实验方法

1. 脱蜡

1) 石蜡切片在 60 ºC 烤箱中预热 30 min（预热时间建议根据不同样本进行适当增减）至石蜡融化；

2) 将切片浸入二甲苯 I，II 中各放置 10 min（建议在染缸中进行）；

3) 在梯度酒精中（100%、95%、90%、80%、70%）室温孵育各 10 min（建议在染缸中进行）；

4) PBS 洗切片两次，每次 2 min（建议在染缸中进行）。

2. 预处理

1） RNA 酶溶液预热至 37 ºC；

2） 将切片放入染缸中，将预热的 RNA 酶溶液加入到染缸中，37 ℃孵育 1 h；

3） PBS 洗切片两次，每次 2 min（建议在染缸中进行）。

3. 蛋白酶 K 消化

1) 蛋白酶 K 工作液预热至 37 ºC；

2) 每张切片滴加蛋白酶 K 工作液 100 μL，37 ºC 孵育 20 min（消化时间建议根据不同样本进行适当增减）；

3) 每张切片滴加 100 μL 2× Buffer C 在室温下漂洗切片 3 次，每次 1 min；

4) 梯度酒精 70%、80%、90%、100%脱水，每次 2 min，空气中干燥（建议在染缸中进行）。

4. 杂交

探针杂交液配制：

成分	体积
Buffer E	5 μL
Buffer D	2.5 μL
探针(0.5 μM)	2.5 μL

1) 擦干载玻片上除样品以外的部分，将载玻片按顺序摆放；

2) 滴加 5 μL 探针杂交液于样品上，盖上盖玻片，用纸巾擦去盖玻片外的探针混合液；

3) 用封片胶封住盖玻片；85 ℃ 变性 6 min；杂交仪内 37℃ 杂交过夜（避光）；

5. 杂交后洗涤

1) 配制 20% Buffer D（10 mL Buffer D +40 mL 2× Buffer C），加入染缸中 37 ℃温育，同时另外两个染色缸内各 50 mL 2× Buffer C，37 ℃温育；

2) 用镊子除去封片胶，用镊子轻轻推动载玻片，检查是否有未除干净的封片胶；放入 37℃温育过的 20% Buffer D 染缸中，37℃洗净 5 min；

3) 从染缸取出载玻片，放入 37 ℃温育过的 50 mL 2× SSC（Buffer C）染缸，37 ℃洗涤 5 min 2 次（盖玻片会自然脱落）；

6. 擦干载玻片上除样品以外的部分（注意有铅笔标记的一侧为样品侧）；滴加 200 μL DAPI 工作液覆盖样品，避光染色 5 min；1× PBS 洗 1 min，用纸巾擦干除样品以外的部分，滴加 5 μL 抗荧光猝灭剂，盖上盖玻片，显微镜下观察。