



GenePharma

股票代码: 430601

吉玛基因

www.genepharma.com

DNA 荧光原位杂交试剂盒 (细胞爬片) 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>



B075-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 A (trypsin/EDTA)	1 mL	室温
Buffer B (Pepsin)	1 mL	-20 °C
Buffer C (20× SSC)	20 mL	室温
Buffer D (去离子甲酰胺)	30 mL	4 °C
Buffer E (杂交液)	200 µL	-20 °C
抗荧光猝灭剂	300 µL	4 °C
75 mM KCl	10 mL	室温
醋酸	10 mL	室温
甲醇	20 mL	室温
RNase A	1 mL	4 °C
DEPC 水	6 mL	-20 °C
DAPI	15 µL	-20 °C
阳性对照探针	1 OD	-20 °C
阴性对照探针	1 OD	-20 °C
靶标探针	2 OD	-20 °C

三、试剂配制

1. Buffer C 母液为20×, 用一级纯水稀释成4×、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. Pepsin 溶液: 向 50 mL 0.01 M HCl 里加入 50 µL Buffer B(Pepsin)。
4. DAPI 工作液: 用 PBS 按照 1:1000 稀释, 需避光保存和使用。

注意:

1. 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。



2. 实验过程中常用试剂, 如 PBS 缓冲液、乙醇等请您自备。
3. 探针配制方法及保存请参考探针使用报告。
4. 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. 细胞悬浊液制备:
 - 1) 除去培养基, 1× PBS 洗涤 2 次;
 - 2) 添加 0.5 mL Buffer A (trypsin/EDTA), 37°C 温育 5 min;
 - 3) 添加 4.5 mL 培养基, 充分吸打;
 - 4) 将细胞移入 15 mL 离心管, 1000 rpm 2 min 离心;
 - 5) 吸去上清, 添加 5 mL 1× PBS, 1000 rpm 2 min 离心;
 - 6) 吸去上清, 添加 3 mL 75 mM KCl, 轻轻吸打溶液;
 - 7) 室温静置 8 min;
 - 8) 静置结束后添加 3 mL Carnoy 溶液 (醋酸: 甲醇=1: 3), 轻轻吸打溶液;
 - 9) 1000 rpm 2 min 离心;
 - 10) 吸去上清, 添加 3 mL Carnoy 溶液, 1000 rpm 2 min 离心。重复以上操作 3 次;
 - 11) 吸去上清, 添加 0.5-1 mL Carnoy 溶液。
- 注: 细胞悬浊液于-20 °C保存, 可用数月。使用时 1000 rpm 2 min 离心, 吸去上清, 添加同体积新鲜 Carnoy 溶液。
2. 滴 10 μL 细胞悬浊液于载玻片上, 用金刚石笔标记样品位置, 风干样品;
 3. 载玻片放入 50 mL 1× PBS 染缸 I 中, 洗涤 5 min 3 次(每次需更换新鲜 1× PBS);
 4. 从染缸 I 取出载玻片, 放入 37 °C温育好的 RNA 酶溶液染缸 II, 37 °C孵育 1 h;
 5. 从染缸 II 取出载玻片, 放入 50 mL 1× PBS (注意用新鲜 1× PBS) 染缸 III, 洗涤 5 min 3 次(每次需更换新鲜 1× PBS);
 6. 从染缸 III 取出载玻片, 放入 37 °C温育好的 Pepsin 溶液染缸 IV, 37 °C孵育 5 min;
 7. 从染缸 IV 取出载玻片, 放入 50 mL 1× PBS (注意用新鲜 1× PBS) 染缸 V, 洗涤 5 min 3 次(每次需更换新鲜 1× PBS); 洗涤的同时配制 70%乙醇和 85%乙醇;
 8. 打开杂交仪, 安装湿条, 确认使用的杂交程序正常; 同时进行探针准备 (注意避光);

9. 从染缸取出载玻片，依次侵入 70% 乙醇，85% 乙醇，100% 乙醇各 5 min，自然风干（注意不要使细胞干燥）；
10. 探针杂交液配制：

成分	体积
Buffer E	5 μ L
Buffer D	2.5 μ L
探针(0.5 μ M)	2.5 μ L

11. 擦干载玻片上除样品以外的部分（有铅笔标记的一侧为样品侧），将载玻片按顺序摆放；
12. 滴加 5 μ L 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；
13. 用封片胶封住盖玻片；85 $^{\circ}$ C 变性 6 min；杂交仪内 37 $^{\circ}$ C 杂交过夜（避光）；
14. 配制 20% Buffer D（10 mL Buffer D + 40 mL 2 $\times$ Buffer C），加入染缸中 37 $^{\circ}$ C 温育，同时另外两个染色缸内各 50 mL 2 $\times$ Buffer C，37 $^{\circ}$ C 温育；
15. 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 $^{\circ}$ C 温育过的 20% Buffer D 染缸中，37 $^{\circ}$ C 洗净 5 min；
16. 从染缸取出载玻片，放入 37 $^{\circ}$ C 温育过的 50 mL 2 $\times$ SSC (Buffer C) 染缸，37 $^{\circ}$ C 洗涤 5 min 2 次（盖玻片会自然脱落）；
17. 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 μ L DAPI 工作液覆盖样品，避光染色 5 min；1 $\times$ PBS 洗 1 min，用纸巾擦干除样品以外的部分，滴加 5 μ L 抗荧光猝灭剂，盖上盖玻片，显微镜下观察。

五、实验案例

5.1 293 细胞 CTGF 基因

