

FISH 原位杂交检测（直接法）通用型试剂盒

产品编号： PR -004503-01

试剂盒规格：100T

储存温度：4℃储存，一年有效

本试剂盒为通用型原位杂交检测试剂盒（无探针），需配合 Fish 原位杂交探针（直接法）进行检测，根据实验目的在杂交液加入特异标记（如 FITC 、CY3 等荧光标记）的检测探针，即可实现目的基因的原位杂交实验检测。

试剂盒组成：

名称	规格	储存条件
3%柠檬酸	10ml	4℃
浓缩型胃蛋白酶	2ml	4℃
预杂交液	4ml	4℃
Triton X -100	50ul	4℃
杂交液	通用型， 2mlX2	4℃
DAPI 染液	即用型， 5ml	4℃

用户自备试剂：

原位杂交专用固定液、 DEPC

杂交洗涤液（2XSSC、0.5XSSC、0.2xSSC）

1xPBS(DNase / RNase free)

超纯水（ DNase / RNase free ）

封片胶（原位杂交专用）

操作步骤：

1、样本准备：

(1) 石蜡切片：新鲜标本，原位杂交专用固定液（4%多聚甲醛，0.1%DEPC 处理）固定，固定时间根据组织大小而定，然后进行常规脱水、浸蜡、包埋，切片厚度 6-8um,常规脱蜡至水，超纯水洗涤 2 次。

(2) 细胞爬片和冰冻切片：原位杂交专用固定液固定冰冻切片 5-10min、细胞爬片病毒自长中台病理平台固定 10-30min，超纯水洗涤 5minx3 次。

2、暴露核酸片段（可选）

工作液配制：1ml3%柠檬酸溶液中滴加 2 滴浓缩型胃蛋白酶，建议现配现用。

根据组织 / 细胞特点进行时间调整，一般组织 37℃消化 2-10min，细胞爬片消化

时间较短, 5-120s, 也可以尝试不消化进行。1xPBS 洗涤 3 次 x5min。

3、破膜 / 通透 (可选)

工作液配制: 取 10 μ L Triton X -100 原液, 加入 10mlPBS 中, 充分涡旋混匀, 配成 0.1%Triton X -100 工作液, 4℃保存。

如果胃蛋白酶通透效果不理想, 可以根据样本类型, 增加 Triton X -100 通透, 组织切片一般室温通透 5-10min, 细胞样本时间较短, 建议 3-5min。1xPBS 洗涤 3 次 x5min。

注: 对于细胞样本和易脱片的组织样本, 胃蛋白酶消化后, 进行 Triton X -100 二次通透, 会增加细胞变形和脱落的风险, 应严格控制消化和通透时间, 其中细胞爬片也可以尝试不消化, 如有必要, 胃蛋白酶消化或 TritonX -100 通透后进行后固定。

4、预杂交

湿盒加入足量水以保持湿度, 每张切片加 20-40 μ L 左右的预杂交液, 38-42℃恒温孵育 2-4 小时。

5、探针杂交

探针储存液: 用 DEPC 水溶解探针粉末, 配成 100 μ M 探针储存液备用。

根据样本种类及特性配制适当浓度探针杂交工作液, 取适量探针储存液加入杂交液中混合, 制成终浓度为 0.5 μ M 或 5 μ g / mL 的探针杂交工作液 (浓度可根据实验结果情况进行调整)。

切片去除预杂交液, 不洗, 每张切片加 20-40 μ L 左右探针杂交液。切片用盖玻片覆盖, 周围用封片胶封片。45℃恒温孵育过夜 (据杂交情况调节)。

6、杂交后洗涤

样本揭掉盖玻片, 37℃预热 2XSSC 洗片 5minx3 次; 37℃预热 0.5xSSC 洗片 15minx1 次; 37℃预热 0.2xSSC 洗片 15minx1 次 (若有非特异性染色, 0.2XSSC 重复洗片 15minx1-2 次)

7、DAPI 染核

DAPI 染液覆盖组织, 避光孵育 5-20min。1xPBS 洗片 5minx3 次。

8、封片

抗荧光淬灭封片剂、甘油或水溶性封片剂封片。

注意事项

1. 所有在离心管或冻存管中保存的试剂, 每次开启前需瞬时离心后再小心轻柔打开盖

子。

2. 建议以参照基因探针进行预实验，确定实验样本合适的杂交条件，再进行目的基因的 FISH 实验检测。

3. 为避免产品降解或样品损坏影响实验结果，实验操作遵循遵循 DNA 及 RNA 实验操作要求。

4. 胃蛋白酶消化 / TritonX -100 通透后，可以对组织切片 / 细胞爬片进行后固定，用于稳定被消化后松散的组织结构，防止在后续步骤中脱落或变形，后固定方法：将切片浸入新鲜配制的 1% 多聚甲醛溶液中，室温固定 5-10 分钟。

5. 使用过程请佩戴一次性手套等防护用品。