

## FISH 细胞玻片标本准备

### 实验材料/实验仪器:

**细胞:** 培养细胞或其他细胞样品

**溶液 I:** 0.4% KCL。4°C 储存。

**溶液 II:** 0.8% 柠檬酸钠。4°C 储存。

**固定剂:** 乙醇: 乙酸=3: 1, 新鲜配制。

### 实验仪器:

- 玻片
- 玻片加热器
- 显微镜

### 实验步骤:

- 1.1.1 使用 15mL 离心管收集 10,00-100,000 细胞。
- 1.1.2 1,000g 离心 5 分钟沉淀细胞。
- 1.1.3 弃去大部分培养基, 只留约 0.2mL。
- 1.1.4 在 0.2mL 培养基中温和重悬细胞沉淀。
- 1.1.5 逐滴加入 10mL 1:1 混合的 0.4% KCl : 0.8% 柠檬酸钠。
- 1.1.6 颠倒离心管数次温和混匀。
- 1.1.7 37°C 水浴 20 分钟。
- 1.1.8 加入 0.1 mL 新制固定剂 (3:1 乙醇: 醋酸)。
- 1.1.9 颠倒离心管数次温和混匀。
- 1.1.10 1,000g 离心 5 分钟收集细胞。
- 1.1.11 去大部分上清, 只留大约 0.1mL。
- 1.1.12 轻敲管底, 重悬细胞沉淀。

1.1.13 逐滴加入 5mL 固定剂（3:1 乙醇：醋酸），混合均匀。

1.1.14 室温静置 20 分钟。

1.1.15 3,000g 离心 5 分钟沉淀细胞，弃去上清。

1.1.16 用固定剂重复洗涤 3 次。

1.1.17 在 1mL 固定剂中重悬细胞并置于冰上，直到下一步实验。

注：固定剂中的细胞可在-20°C 保存一年。

1.1.18 3,000g 离心 5 分钟。

1.1.19 弃去上清，加入 1 mL 新制固定剂（3:1 乙醇：醋酸）。

1.1.20 重悬细胞。

1.1.21 在室温下，在载玻片上滴加 5-10  $\mu$ L 细胞悬液。

1.1.22 等待样品自然干燥。

1.1.23 使用光学显微镜，在 20 倍物镜下观察玻片样品。

1.1.24 一个视野中的推荐细胞密度为约 50-200 个细胞。

- 如果细胞密度过低，则在玻片的样品上再滴加 5-10  $\mu$ L 细胞悬液并晾干。重复滴加-晾干-观察的步骤，直到视野中的细胞数合适。
- 如果细胞密度过高，则使用固定剂稀释细胞悬液样品，重复稀释-观察的步骤，直到视野中的细胞数合适。

1.1.25 额外准备 2-3 份玻片标本。

1.1.26 56°C 烘焙玻片标本过夜。

1.1.27 将玻片标本用于 FISH 探针实验。

1.1.28 将剩余的玻片标本至于无水乙醇中-20°C 保存。

注：封闭玻片能在-20°C 下稳定储存 12 个月。剩余的细胞悬液可在-20°C 下储存 1 年，以备有准备更多玻片标本之需。