

VividFISH™ FISH LSI

探针试剂盒

广州高新技术产业开发区

广州科学城掬泉路 3 号

广州国际企业孵化器 F 区 8 楼

510663

电话：4006-020-200；020-32068595

I. 产品

产品	货号	规格	运输条件	储藏条件
VividFISH™ FISH LSI 探针	多种	100 µl (1x)	冰袋	-20°C 下能稳定储藏至少 1 年。
AntiFade w/DAPI I	FP201	250µl (1x)	冰袋	

II. 探针描述

VividFISH™ FISH 探针的杂交溶液中含有荧光基团标记的 DNA 以及封闭 DNA。VividFISH™ FISH LSI 探针为即用型。

III. 材料

i. 实验试剂及仪器：

乙醇（100%）、20×SSC、NP-40、橡胶胶水、荧光显微镜用的浸镜油，22×22mm 以及 24×24mm 盖玻片、可调整的移液枪及枪头、计时器、金刚石划线器、医用镊子、玻片染色缸（50mL）、温度计、涡旋混合器、带盖玻片盒、小型离心机、热循环仪、切片加热器、水浴、循环水浴缸(73±1°C)、恒温箱或玻片杂交仪、配有合适滤镜的荧光显微镜。

ii. 溶液准备（试剂盒未包含）：

预处理溶液： 50mL 2xSSC、0.5%NP-40，pH7.0，4°C 储存。

变性溶液： 50mL 70% 甲酰胺；新鲜配制的 1xSSC，pH7.0。

洗涤缓冲液： 100mL of 0.5xSSC、0.1%NP-40，4°C 储存。

IV. 玻片预处理：

注： 细胞玻片标本的准备步骤请参考以下 GeneCopeia 网址：

http://www.genecopeia.com/wp-content/uploads/2016/02/Cell-slide-prep_2016.pdf).

• 细胞或染色体玻片标本

(a) .在玻片标本瓶中加入 50mL **预处理溶液**，在 37°C 水浴中预热。

(b) 将玻片标本放在预热到 37°C 的**预处理溶液**，孵育 30 分钟。

(c) 将玻片标本置于 70%、90% 和 100%乙醇中各脱水 1 分钟，然后风干。

(d) 将玻片标本放进标本盒，室温保存直到下一步。

• FFPE 玻片标本：按照预处理试剂盒制造商提供实验步骤进行。

(GeneCopoeia Inc 提供 FFPE 预处理试剂盒 (FP204))。

V. 探针准备:

- 室温融化 **FISH 探针**，涡旋混匀。短暂离心，再次轻轻震荡混匀。

注: 试剂盒中的 **VividFISH™ 探针**可直接使用。稀释探针可能会降低 FISH 信号的强度。

VI. 杂交:

1. 在 42°C 恒温箱中预热一个保湿盒。
2. 在玻片标本瓶中加入 50mL **变性溶液**，在 73±1°C 循环水浴中预热。
3. 将第 IV 步预处理过的波频标本放进 73±1°C **变性溶液** 5 分钟。
4. 将玻片标本置于 70%、90% 和 100%乙醇中各脱水 1 分钟，然后风干。
5. 取第 V 步准备好的 FISH 探针溶液（每张玻片标本取 10μL）置于离心管内，80° C 变性 5 分钟，然后放在冰上。
6. 短暂离心，轻轻震荡混匀。
7. 滴加 10μL FISH 探针溶液至每个玻片的样本上，去掉气泡。
8. 将 22 x 22 mm 盖玻片小心地盖在 FISH 探针溶液上，等待溶液慢慢在盖玻片下扩散直至充满。
9. 用橡胶水泥封闭盖玻片四周。
10. 将玻片置于 42° C 恒温箱里预热的保湿盒内，孵育 16-24 小时。
11. 继续进行**杂交后洗涤**步骤。

VII. 杂交后洗涤

12. 循环水浴 73±1°C 预热一个 50mL 装有 0.5xSSC+0.1%NP40 的玻片标本瓶。
13. 用小镊子除去封装的橡胶胶水（避免扰动盖玻片）。
14. 将玻片标本置于装有 2xSSC 的玻片标本瓶中，轻轻摇晃，使盖玻片漂离。
15. 将玻片标本置于 73±1°C 预热的 0.5xSSC+0.1%NP40 中孵育 5 分钟，孵育过程中不时轻轻搅动玻片。
16. 将玻片标本转移到 常温的 2xSSC+0.1%NP40 中，室温孵育 1 分钟。
17. 用 ddH₂O 漂洗一下，沥去多余的液体并风干。
18. 滴加 15μL 的 **AntiFade w/ DAPI I** 于样本上，去除气泡。
19. 将 24 x 24 mm 盖玻片小心地盖在 **AntiFade w/ DAPI I** 上，等待溶液慢慢在盖玻片下扩散直至充满。
20. 将玻片标本避光放置 10-15 分钟。
21. 使用荧光显微镜及适合的滤光片观察（参数见附录）。

注：如需长期保存玻片标本，请使用指甲油封闭盖玻片边缘，并-20°C 避光保存。

VIII. 附录：荧光显微镜参数

- **显微镜：**带 100 瓦特水银灯泡的荧光显微镜。
- **物镜：**25X 至 100X 物镜，结合 10X 目镜使用。如需进行 FISH 信号计数，可通过 60X 或 100X 油浸物镜获得理想的效果。
- **滤光片：**滤光片都是配合特定荧光染料设计的，因此必须有针对性地进行选择。

荧光染料	激发波长	发射波长	匹配的滤光片
DAPI	345 nm	455 nm	DAPI (蓝)
绿	496 nm	520 nm	FITC (绿)
橙	552 nm	576 nm	5-TAMRA (橙)