

FFPE 预处理试剂盒 I

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. 试剂盒成分

产品	货号	规格	运输条件	储存条件
Pretreatment Solution	FP202-010	5 mL (100x)	冰袋	4°C 下能稳定 6 个月；-20°C 下能稳定储藏至少 1 年。
Protease I	FP203-010	5 mL (1x)	冰袋	

注 1: 如需进行长期储存, 可将 **Protease I** 溶液分装并存于 -20°C。1-2 次冻融不会对蛋白酶活性产生明显的影响。

注 2: 冻结的 **Protease I** 使用前应在 4°C 下融解。融解后试剂中有可能出现少量沉淀, 将 **Proteinase I** 置于冰上 15-20 分钟并间歇地温和震荡, 即可使沉淀完全融解。切勿涡旋。

II. 实验步骤

实验试剂、材料及仪器：

- 乙醇（100%）、20×SSC、NP-40、Hemo-De（或 Xylene）、可调整的移液器及枪头、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、带正电的玻片、带盖玻片盒、小型离心机、切片加热器、热循环仪（37°C）、纯水水浴（40 ± 2°C）、循环水浴缸（85 ± 1°C）、显微镜用薄片切片机。

样品收集与处理：

注：样品应避免暴露在酸（如脱钙剂）、强碱和极端高温环境中。这些环境条件已知都会对 DNA 造成损害，可能会导致 FISH 实验失败。使用的样品应固定在福尔马林（10% 中性缓冲福尔马林）中，组织样品的固定时间为 12-48 小时为佳。经过良好的石蜡化处理后，制成优质组织切片。

- 使用切片机切一组 3-4 μm 厚的细胞石蜡切片。
- 将样品切片漂浮在 40 ± 2°C 的纯水水浴水面。
- 将样品切片从同个方向置于在带正电的载玻片上。
- 待玻片样品自然干燥，再置于 56°C 烘焙 30 分钟或更久。
- 将准备好的玻片样品储存在室温或 -20°C。

脱蜡

- FFPE 玻片样品置于 56°C 烘焙过夜。
- 用金刚石划画笔在 FFPE 玻片背面标定样品区域。
- 将玻片样品浸入室温的 Hemo-De（或 Xylene）中 5 分钟，更换 Hemo-De（或 Xylene）2 次，每次 5 分钟。
- 将玻片样品浸泡室温的无水乙醇 5 分钟，更换 2 次、每次 5 分钟来进行脱水。
- 将玻片样品置于 56°C 的切片加热器上烘干。

玻片预处理

- 在玻片染色缸（50mL）里准备 50mL **1x Pretreatment Solution**。
- 预热到 85 ± 1°C 。
- 将脱蜡后的玻片样品置于 85 ± 1°C 预热好的 **1x Pretreatment Solution**，孵育 60-90 分钟。
- 将玻片样品浸入室温的 2×SSC 1 分钟。

- 将玻片样品浸入纯水 1 分钟。
- 待玻片样品自然干燥。

蛋白酶消化

- 将预处理后的玻片样品置于保湿皿内，37°C 下至少孵育 10 分钟。
- 滴加足量 **Protease I** 溶液（每玻片 400~500 μ L），覆盖玻片上的样品或目的区域。

注：Protease I 溶液在实验过程中应置于 4°C 或放在冰上，使用前不必加温。

- 37°C 孵育 10-20 分钟，

注：孵育时间因应样本组织不同会有差异。最佳孵育时间从 5 分钟到 40 分钟不等，取决于样品的组织类型、固定时间及/或组织的厚度，具体时间应由使用者自行决定。

- 掸去 **Protease I** 溶液，将玻片标本浸入室温的 2 × SSC 2 分钟，
- 将玻片标本在 70%、90%和 100%的乙醇中分别放置 2 分钟脱水。
- 待玻片标本置于 56°C 的切片加热器上烘干，
- 继续进行 FISH 探针实验。如无需马上进行实验，可将玻片样品在-20°C 储存数天。