天净沙系列

CAT#:8-240623

低温运输，-20℃保存

天净沙

DNA Oligo 探针-DNA 靶分子 FISH 试剂盒

DNA Oligo Probe-DNA Target FISH Kit

使用手册 V0.5

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

本产品是一种 DNA Oligo-DNA 荧光原位杂交检测试剂盒。本产品可通过将荧光标记的 DNA Oligo 探针与细胞或组织中的目标 DNA 进行杂交，形成荧光标记的杂交复合物，进而可以在荧光显微镜下观察并确定目标 DNA 细胞内的定位。本产品具有以下特点：

1. 操作简单便捷。通常一天内即可完成检测。
2. 自备的荧光标记 Oligo DNA 探针与其靶 DNA 形成杂交复合物后，可直接进行荧光观察。
3. 背景低、灵敏度高。提供专门的乙酰化试剂和封堵 DNA 溶液，前者可以中和正电基团减少探针的非特异结合，后者可以封堵非特异结合位点减少非特异结合，提高检测灵敏度。
4. 样品适用范围广，可用于多聚甲醛或福尔马林固定的组织、石蜡或冰冻切片以及细胞等样本的靶 DNA 的定位分析。
5. 用户可以选择任何荧光显微镜兼容的荧光探针，不同荧光探针可以分别跟 DAPI、Hoechst 33342、Hoechst 33258、或 Propidium Iodide 等通用细胞核荧光染料结合，便于精准定位荧光探针的杂交位点。本试剂盒只提供 DAPI 染液。
6. 本产品足够 200 次原位杂交检测。
7. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品使用大立盒包装

成分	编号	规格	包装
20 mg/mL 蛋白酶 K 溶液	8-240623a	100 μL	0.5 mL 本色管
乙酰化溶液 A	8-240623b	600 μL	0.5 mL 本色管
乙酰化溶液 B	8-240623c	200 mL	250 mL 本色瓶
杂交溶液	8-240623d	100 mL	125 mL 本色瓶
100×封堵 DNA 溶液	8-240623e	1 mL	1.5 mL 本色管
5 mg/mL DAPI 溶液	8-240623f	200 μL	0.5 mL 本色管
20×洗涤缓冲液	8-240623g	40 mL	60 mL 本色管
使用手册	8-240623sc	1 份	无

运输及保存

低温运输，-20℃保存，有效期半年。20 mg/mL 蛋白酶 K 溶液和 100×封堵 DNA 溶液须-20℃保存；杂交溶液和 5 mg/mL DAPI 溶液须-20℃避光保存；乙酰化溶液 A，乙酰化溶液 B 和 20×洗涤缓冲液可 4℃或室温保存。

自备物品

自备荧光标记的 Oligo DNA 探针，多聚赖氨酸、4%多聚甲醛固定液、DNase/RNase

	free -PBS、去离子甲酰胺、自备 DEPC 水等。
使用方法	**一、细胞样品的预处理** 1. 细胞培养：细胞培养至 6 孔、12 孔或 24 孔板上或盖玻片上(可以使用多聚赖氨酸进行预处理)，待细胞密度达到 70-90%时，用 PBS 洗涤细胞 2-3 次。注：使用多聚赖氨酸预处理可以有效防止后续的检测过程中细胞发生脱落。 2. 固定：加入自备 4%多聚甲醛固定液，室温固定 10 分钟。大多数细胞固定 10 分钟即可，最佳固定时间可适当调整。 3. 洗涤：用自备的 DNase/RNase free-PBS（以下简称 PBS）室温摇床缓慢摇动洗涤 3 次，每次 5 分钟以去除固定液。注：如果细胞容易脱落，可不进行摇动，可延长洗涤时间或增加洗涤次数。后续所有的细胞或切片的洗涤如果容易脱落，都可以不进行摇动，并都可以延长洗涤时间或增加洗涤次数。 **二、冰冻切片的预处理** 4. 新鲜组织用自备 4%多聚甲醛固定液固定，固定时间根据组织大小而定，建议 1-2 小时。切片厚度 5-10 μm 左右，烘干。 5. 洗涤：用自备 PBS 室温摇床洗涤 3 次，每次 5 分钟。 **三、石蜡切片的预处理** 6. 制片：新鲜组织用 4%多聚甲醛固定液固定。固定时间根据组织大小而定，建议 1-2 小时。切片厚度最好不超过 4 μm，烘干。 7. 脱蜡：二甲苯洗涤 2 次，每次 3 min，再用二甲苯/乙醇(1:1)溶液洗涤 3 min。 8. 复水：依次用 100%、100%、95%、70%、50%乙醇洗涤，各洗涤 3 分钟，再用自备 DEPC 水洗涤 2 次，每次 5 分钟。 **四、细胞通透** 9. 通透：加入适量 20 μg/mL 蛋白酶 K，室温消化 2-10 分钟。20 μg/mL 蛋白酶 K 溶液需要用 DEPC 水新鲜稀释 10. 洗涤：用 PBS 摇床洗涤 2 次，每次 5 分钟。 11. 固定：用 4%多聚甲醛固定液室温固定 10 分钟。 12. 洗涤：去除固定液，用 PBS 摇床洗涤 2 次，每次 5 分钟。 **五、降低背景** 13. 中和碱性蛋白：加入适量自备 0.5 M 盐酸浸没细胞，室温摇床洗涤 5 分钟。 14. 洗涤：用 PBS 摇床洗涤 2 次，每次 5 分钟。 15. 乙酰化去正电基团：将乙酰化溶液 A 和乙酰化溶液 B 按照 1:400 的比例混合

均匀成乙酰化溶液。加入适量乙酰化溶液浸没样品，室温摇床洗涤 10 分钟。

16. 洗涤：用 PBS 摇床洗涤 2 次，每次 5 分钟。

六、杂交

17. 配制杂交液：取适量杂交溶液，按照 1:100 加入 100×封堵 DNA 溶液并混匀，加入自备的荧光标记的 DNA Oligo 探针，使其终浓度为 0.5-1 μg/mL，避光配制。
18. 洗涤缓冲液 I：用 DEPC 水将 20×洗涤缓冲液稀释至 4×，再将其与去离子甲酰胺按照 1:1 混合均匀。
19. 洗涤缓冲液 II：用 DEPC 水将 20×洗涤缓冲液稀释至 2×，混匀。
20. 洗涤缓冲液 III：用 DEPC 水将 20×洗涤缓冲液稀释至 1×，混匀。
21. 预杂交：加入适量含 1×封堵 DNA 溶液的杂交溶液浸没细胞，样本密封，防止蒸发，放置 24-65℃避光摇床孵育 20 分钟。
22. 探针预处理：将含探针的杂交液放置 24-65℃避光摇晃 20 分钟后，立刻冰浴 2 分钟，适当混匀后冰浴放置备用。
23. 杂交：去除杂交溶液，滴加含探针的杂交液浸没样本，密封后放置 24-65℃避光摇床杂交 2-12 小时。
24. 探针回收：将含探针的杂交液回收至洁净离心管中，-20℃避光保存。
25. 加入适量预热的洗涤缓冲液 I，24-65℃避光摇床洗涤 3 次，每次 5-20 分钟。
26. 加入适量预热的洗涤缓冲液 II，24-65℃避光摇床 5-20 分钟，1 次。
27. 加入适量预热的洗涤缓冲液 III，24-65℃避光摇床 5-20 分钟，1 次。

七、细胞核染色

28. 用 PBS 避光摇床洗涤 2 次，每次 5 分钟。
29. 细胞核染色：使用适量 0.5-10 μg/mL DAPI 染色液浸没细胞，避光染色 3-5 分钟。用户可以根据探针的荧光染料选择步仙湖干扰的细胞核荧光染料。
30. 用 PBS 避光摇床洗涤 2 次，每次 5 分钟。

八、荧光显微观察

31. 在荧光显微镜下，选用跟探针荧光标记兼容的激发波长和发射波长进行观察核照相，然后选择跟 DAPI 细胞核荧光染料兼容的激发波长和发射波长（~360 nm 激发，~460 nm 发射）进行观察和照相。如果使用自备的其他细胞核荧光染料，此步需要选择相应的波长。
32. 也可以去除 PBS，滴加抗荧光淬灭封片液或抗荧光淬灭 PVP 封片液浸没细胞，

	盖上盖玻片，荧光显微镜下拍照。 33. 拍照后样品可放置 4℃避光保存。
关联产品	DNA 探针-DNA 靶分子 FISH 试剂盒