天净沙系列

CAT#:3-f68800-16S-r

低温运输，-20℃保存

天净沙

细菌 16S rRNA 基因通用红色 FISH 探针

Bacterial 16S rRNA Gene Red FISH Probes

使用手册 V0.51

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

本产品是细菌通用 16S rRNA 红色 FISH 探针,它有几十条红色标记的 Oligo 探针组成，可以跟细菌 16S rRNA 的保守区域互补，故能检测数千种细菌。它不跟其他 RNA 发生交叉反应，故专一性强。它主要用于用 FISH 方法检测切片和涂片样品中是否存在细菌 16 rRNA。本产品的特点是探针为 Oligo，故杂交时间只要 1 小时。本产品只含探针，FISH 杂交试剂需要另购。本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品使用塑料袋包装

成分	编号	规格	包装
细菌通用 16S rRNA 红色 FISH 探针冻干粉	3-f68800-16S-r	10 T	0.5 mL 棕色管
使用手册	sc 3-f68800-16S-r	1 份	无

运输及保存

低温运输，-20℃保存，有效期两年。

自备物品

切片制备试剂、涂片制备试剂、DNA-RNA 原位杂交试剂。

使用方法

一、以细菌涂片进行 FISH

1. 将常规细菌操作得到的细菌悬液滴加到干净的载片上。在光学显微镜下检查确保细菌铺展正常。
2. 用梯度乙醇溶液（70%、90%、100%）依次对样本进行脱水，每个浓度处理 3 分钟。
3. 晾干载片。
4. 将载片浸入到自备的预热到 73℃的自备变性液中保温 4 分钟。变性液的配方是 70%甲酰胺、2×SSC，pH 7.0。
5. 用梯度乙醇溶液（70%、90%、100%）依次对样本进行脱水，每个浓度处理 3 分钟。
6. 晾干载片。
7. 稀释探针: 首次使用本产品时，在每个离心管中加入 50 μL 的自备 FISH 杂交液，涡旋震荡 1 分钟，短暂离心 10 秒后待用。没有用完的探针溶液需要放-20℃保存。
8. 将 FISH 探针混合液放 73℃变性 6 分钟。
9. 将 10 μL FISH 混合液加到第 6 步所得的载片上，并盖上盖玻片。
10. 用橡胶胶水进行密封。
11. 将玻片放入湿盒，37℃放置 60 分钟。此为杂交步骤。
12. 杂交结束后，用手术刀小心地从载片上取下盖片。

13. 将载片转移到装有自备洗涤液 1 的 Coplin 缸中，在室温下轻轻晃动洗涤载片 2 分钟。洗涤液的配方是含 0.1%吐温 20 的 1×PBS。
14. 将载片转移到预热至 58℃的洗涤液 1 中，轻轻晃动孵育 10 分钟。
15. 用自备洗涤液 2 洗涤载片 1 分钟。洗涤液 2 配方是含 0.1%吐温 20 的 2×SSC。
16. 沥干载片上多余的洗涤液 2。
17. 滴加 15-20 μL 自备的含 PI（0.3 μL/mL）或 DAPI（0.3 μL/mL）的抗淬灭液，盖上盖片，用橡胶胶水密封盖片，暗处放置 15-20 分钟。
18. 在荧光显微镜下用 552 nm 激发波长和 570 nm 发射波长进行观察。

二、以切片进行 FISH

19. 准备工作：将 10 mM 柠檬酸（预处理缓冲液）在水浴中加热至 96-99℃；将 40 mL 0.01 M 盐酸在水浴中温热至 37℃；将烤箱加热至 90℃；配制 1 mL 20 mg/mL 的胃蛋白酶储备液。
20. 将切片放 90℃烤箱中老化 20 分钟。
21. 二甲苯脱蜡两次，每次 5 分钟。
22. 100%乙醇浸泡两次，每次 2 分钟。
23. 晾干切片。
24. 将切片放入预热到 96-99℃的柠檬酸缓冲液（pH≈6.8）中 30-60 分钟。时间根据组织类型和大小而变化，可能需要自行摸索。
25. 用 2×SSC 洗涤切片 2 分钟。
26. 将切片放入胃蛋白酶工作液中 37℃保温 20-40 分钟。时间根据组织类型和大小而变化，可能需要优化。胃蛋白酶工作液的配制方法是在 40 mL 预热到 37℃的 10 mM 盐酸溶液中加入 1 mL 20 mg/mL 的胃蛋白酶储备液，充分混合即可。此溶液最好现配现用。
27. 用 2×SSC 洗涤切片 1-2 分钟。
28. 将切片浸入 70%乙醇中 30 秒。
29. 将切片浸入 100%乙醇中 30 秒。
30. 晾干切片。
31. 将第 8 步所得 10 μL 探针溶液滴加入到切片上，然后小心盖上盖片，不要有气泡。

	32. 用橡胶胶水密充分封盖玻片。 33. 将切片放 75℃保温 7 分钟。 34. 将切片放 37℃保温 1 小时。 35. 孵育结束后，小心移除橡胶胶水和盖片。 36. 用预热到 73℃的洗涤液 1 中洗涤切片 2 分钟。前 10-15 秒最好用力晃动。 37. 用常温的洗涤液 2 常温洗涤切片 2 分钟。前 10-15 秒最好用力晃动。 38. 擦干切片背面，让切片之外的部分在暗处完全晾干。 39. 滴加 15-20 μL 含 PI（0.3 μL/mL）或 DAPI（0.3 μL/mL）的抗淬灭液，盖上盖片，用橡胶胶水密封盖片，暗处放置 15-20 分钟。 40. 在荧光显微镜下用 552 nm 激发波长和 570 nm 发射波长进行观察。
关联产品	DNA-DNA 原位杂交液