

# 人着丝粒荧光原位杂交检测试剂盒 (CY5)

Human Telomere Fluorescent In Situ Hybridization (FISH) with CY5 probe Kit

注:本产品干冰运输;试剂按说明书分别保存于4°C及-20°C,保质期12个月。

序号	试剂	货号及规格			储存
		IFH014 (30T)	IFH014M (50T)	IFH014L (100T)	
01	抗荧光衰减封片剂	0.9 mL	1.5 mL	3 mL	4°C
02	1×TBS	2.4 mL	4 mL	8 mL	4°C
03	去离子甲酰胺	1.2 mL	2 mL	4 mL	4°C
04	蛋白酶 K(2mg/mL)	12 μL	20 μL	40 μL	-20°C
05	杂交液	1.2 mL	2 mL	4 mL	-20°C
06	DAPI	1.2 mL	2 mL	4 mL	-20°C
07	RNase	12 μL	20 μL	40 μL	-20°C
08	探针 (CY5)	30 μL	50 μL	100 μL	-20°C
09	封片膜	50张	100张	150张	—

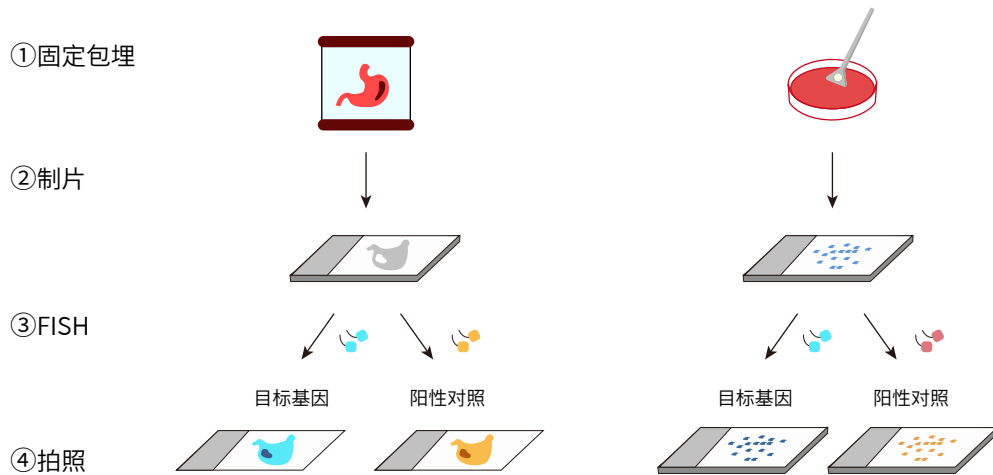
## 产品简介/Product Description

荧光原位杂交 (Fluorescent in situ hybridization, FISH) 是将经荧光素标记的寡核苷酸探针与变性后的染色体、细胞或组织中的核酸按照碱基互补配对原则进行杂交,再经变性、退火、复性、洗涤后,形成靶 DNA 或 RNA 与核酸探针的杂交体,最后,在荧光显微镜下显影,从而对待测 DNA 或 RNA 进行定性和定位分析。本试剂盒针对端粒的 DNA 片段设计端粒探针并进行 DNA-FISH,可应用于 DNA 染色体端粒定位、染色体结构、转基因分析等。

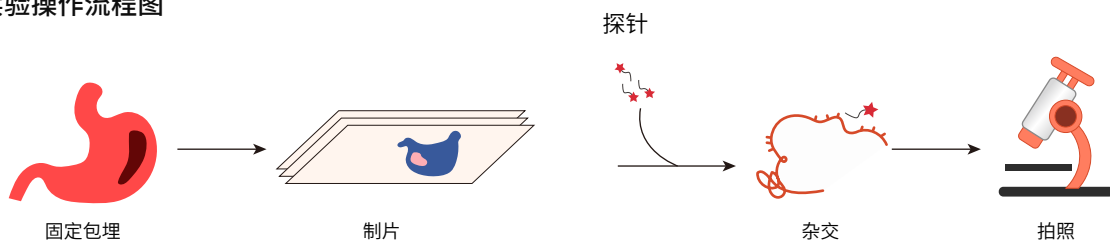
本试剂在常规染色基础上进行原位杂交染色，为医师提供诊断的辅助信息。其检测结果仅供临床参考，不应作为临床诊断的唯一依据，临床医生应结合患者病情、药物适应症、治疗反应及其它实验室检测指标等因素对检测结果进行综合判断。

## 技术路线/Technology mapping

### 1. 原理流程图



### 2. 实验操作流程



## 使用流程/Procedure

### 1. 样本前处理及制片

#### (1) 石蜡切片 / 组织芯片

①脱蜡：将石蜡切片置于二甲苯中，浸没脱蜡 3 次，每次 5min；

**注意：脱蜡前将切片置于烘片机上，56℃ 烘片 30min，使蜡软化；**

②复水（选做）：切片浸入无水乙醇，室温浸泡 10min；依次经 90%、80%、70% 乙醇梯度复水，每个梯度 3min。

③洗涤：放入去离子水中 95℃ 孵育 30min，取出甩干水分。

#### (2) 冰冻切片

①烘片及固定：从 -80℃ 取出冰冻切片，快速转移至预热的烘片机，56℃ 烘片 30min；切片浸入 4℃ 预冷的 90% 乙醇，室温固定 20min；室温静置干燥。

②复水（选做）：切片浸入无水乙醇，室温浸泡 10min；依次经 90%、80%、70% 乙醇梯度复水，每个梯度 3min；去离子水浸洗切片 1 次，5min。

**注意：固定组织做的冰冻切片需进行步骤（②复水）；新鲜组织的冰切无需进行此步骤。**

#### (3) 细胞爬片

①固定：细胞爬片置于 6 孔板中，加入 4% 多聚甲醛，室温固定 20min；加入 1mL DEPC 水洗涤 2 次，每次 5min。

**注意：可加少量 1×PBS 置于 4℃ 冰箱中短暂保存。**

#### (4) 滴片 (染色体)

①低渗处理: 细胞培养汇合度 60%~80% 时, 加入适量秋水仙素 (200ng/mL), 37°C处理 2h; 胰酶消化细胞至 15 mL 离心管中, 室温 1200r/min 离心 5min, 去上清, 1×PBS 轻轻悬浮清洗细胞沉淀; 加入 5-8mL 37°C预热的 KCl 低渗液, 轻轻吹打悬浮细胞, 37°C孵育 20-40min, 期间轻轻吹打 2~3 次。

②固定: 缓慢加入 1mL 甲醇 - 冰醋酸固定液 (甲醇 : 冰醋酸 (V/V) =3:1), 轻轻吹打悬浮细胞, 预固定 3min, 室温 200g 离心 5min, 去上清; 缓慢加入 8 mL 甲醇 - 冰醋酸固定液, 轻轻吹打悬浮细胞, 固定 40min; 离心, 轻轻吸去上清, 重复固定 40min, 室温 200g 离心 5min, 去上清, 再加入适量固定液, 轻轻重悬细胞。

③滴片: 移液枪吸取少量细胞悬液, 于 20~30cm 的高度, 将悬液滴到载玻片上, 每张片子 2~3 滴; 75°C干燥 3h 左右, 待玻片自然冷却至室温后, 编号, 保存备用。

#### 注意:

1. 低渗处理的细胞悬液置 -20°C冰箱中可保存 1 个月; 在此期间可随时取出, 离心去上清后加入新鲜固定液;
2. 固定好的细胞需立即滴片, 载玻片需事先 -20°C预冷;
3. 建议勿将制好的片子室温干燥下放置过久, 易影响信号质量。

#### 2. 杂交

①RNase 处理 (选做): RNase 与 1×TBS 按 1:100 比例配制工作液; 每张玻片滴加 20~40μL, 37°C孵育 1h; 2×SSC 洗涤 1 次, 5min;

②老化: 0.1%NP-40/2×SSC 浸泡 1 次, 30min;

③消化: 蛋白酶 K 与 1×TBS 按 1:100 比例配制消化工作液; 每张玻片滴加 20~40μL, 37°C孵育 10min; 依次经 70%、80%、90%、100% 乙醇梯度脱水, 每个梯度 5min;

④探针及样本变性: 每张玻片滴加 20~40μL 变性液, 盖膜 将探针与杂交液按 1:39 比例配制杂交反应液, 充分混匀; 玻片与杂交反应液置于 75°C热变性 5~8min;

⑤杂交: 杂交反应液快速转移至冰上, 静置 2~10min; 玻片依次经 70%、80%、90%、100% 乙醇梯度脱水, 每个梯度 1min, 自然风干; 滴加 20~40μL 杂交反应液于玻片杂交区, 盖膜, 快速转移至 37°C杂交过夜 (16h~20h);

⑥洗涤: 53°C预热的 2×SSC 洗涤 1 次, 5min; 42°C预热的含 0.1%NP-40/2×SSC 洗涤 1 次, 5min; 42°C预热的 2×SSC 洗涤 1 次, 5min;

⑦DAPI 染核: 滴加 20~40μL DAPI, 盖膜, 避光染色 10min; 1×PBS 洗涤 2 次, 每次 5min, 避光晾干;

⑧荧光显微镜观察: 滴加 10~30μL 抗荧光衰减封片剂封片; 荧光显微镜 / 激光共聚焦拍照, 或 -20°C避光暂存。

#### 注意:

1. 玻片、反应液体系应避免干燥;
2. 杂交液应提前拿出恢复至室温后再使用;
3. 玻片上可设置多个杂交区;
4. 加探针后, 所有操作步骤应避光进行;
5. 杂交时间可适当延长至 48h;
6. 0.1%NP-40/2×SSC 洗涤非特异性杂交信号时, 也可以洗掉没有杂交上的探针;
7. DAPI 用量视样本大小而定;
8. 封片剂用量视样本大小而定;
9. 自备试剂: 20×SSC(3M 氯化钠 +0.3M 柠檬酸三钠); KCl 低渗液 (0.075M)

#### 注意事项/Notes

1. 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内;
2. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

