



石蜡切片 荧光原位杂交三染（FISH）实验报告

1. 实验器材及试剂

1.1.实验器材

名称	厂家	型号
脱水机	DIAPATH	Donatello
粘附载玻片（石蜡切片）	上海希柏徠生物科技有限公司	G6012-1
盖玻片	江苏世泰实验器材有限公司	10212432C
病理切片机	上海莱卡仪器有限公司	RM2016
无酶离心管	上海希柏徠生物科技有限公司	EP-150-M
数显钟摆摇床(智能型，大托盘)	上海希柏徠生物科技有限公司	DS-2S100
涡旋混匀仪器	上海希柏徠生物科技有限公司	SMV-3500
移液器	上海希柏徠生物科技有限公司	SPIP-10/100/200/1000
免疫组化笔	上海希柏徠生物科技有限公司	G6100
冰箱	青岛海尔股份有限公司	BCD-192TGN
正置荧光显微镜	日本尼康	NIKON ECLIPSE CI
成像系统	日本尼康	NIKON DS-U3
恒温恒湿培养箱	天津市莱玻特瑞仪器设备有限公司松	HWS-100A
高压灭菌锅	下健康医疗	MLS-3751L-PC
包埋机	武汉俊杰电子有限公司	JB-P5
冻台	武汉俊杰电子有限公司	JB-L5
组织摊片机	浙江省金华市科迪仪器设备有限公司	KD-P

1.2.主要实验试剂

试剂	厂家	货号
DEPC 水	武汉赛维生物科技有限公司	G3004
4%多聚甲醛（DEPC 水）	上海希柏徠生物科技有限公司	G1113
切片石蜡 58-60	上海希柏徠生物科技有限公司	WGHB-319213129
无水乙醇	国药集团化学试剂有限公司	100092683
环保型脱蜡透明液	上海希柏徠生物科技有限公司	G1128
PBS 缓冲液	上海希柏徠生物科技有限公司	G0002
20×SSC 洗脱液	上海希柏徠生物科技有限公司	G3015





牛血清白蛋白 BSA 进口	上海希柏徠生物科技有限公司	GC305006-100g
重组蛋白酶 K	上海希柏徠生物科技有限公司	G1234
DAPI	上海希柏徠生物科技有限公司	G1012
抗荧光淬灭封片剂	上海希柏徠生物科技有限公司	G1401
杂交液	上海希柏徠生物科技有限公司	G3045/G3051/G3046

1.3 探针信息及修复条件

修复条件	消化条件	探针名称	探针序列 (5' -3')	探针浓度	杂交温度	对应的分支 探针名称	对应的信号 探针名称

(备注：探针加样顺序按照探针书写顺序)

2. 石蜡切片 SweAMI-荧光原位杂交三染实验步骤

- 2.1 组织固定：组织取出 PBS 漂洗后立即放入原位杂交固定液（动物）中固定 12h 以上，4° 保存运输。
- 2.2 脱水浸蜡包埋：组织固定完成后在通风橱内切取目的区域组织块约 3mm 厚，经由低到高梯度酒精脱水后二甲苯透明，浸蜡包埋。
- 2.3 石蜡切片：组织石蜡块切片机切片 4 μm 厚，摊片机展片捞片，62° 烤箱烤片 2h。
- 2.4 石蜡切片脱蜡至水：依次将切片放入环保型脱蜡透明液 I 15min-环保型脱蜡透明液 II 15min-无水乙醇 I 5min-无水乙醇 II 5min-85%酒精 5min-75%酒精 5min，DEPC 水浸泡。
- 2.5 修复及消化：根据组织类型，固定时间长短及指标的定位，选用不同的修复液进行修复，具体修复条件见上表。自然冷却，后组化笔画圈，根据不同组织不同指标特性，滴加蛋白酶 K (20ug/ml) 40° 消化，消化时间见上表。纯水冲洗后 PBS 洗 3 次，每次 5min。
- 2.6 预杂交：滴加预杂交液，40° C 孵育 1h。
- 2.7 杂交：倾去预杂交液，滴加含探针杂交液，恒温箱杂交过夜。杂交条件见上表。
- 2.8 杂交后洗涤：洗去杂交液，2×SSC，40° C 洗 10min，1×SSC，40° C 洗 2×5min，0.5×SSC 室温洗 10min。若非特异杂交体较多，可以添加甲酰胺进行洗涤。
- 2.9 滴加对应的分支探针杂交：轻轻甩干切片，滴加已预热的相应的分支探针杂交液（见上表及附表）（60 μL），水平置于湿盒内 40℃ 杂交 45 min。此过程中在湿盒底部加入 50ml 2 × SSC，防止干片。
- 2.10 杂交后洗涤：倾去杂交液，将切片依次用 40° C 预热的 2× SSC、1× SSC、0.5× SSC、0.1× SSC 于 40° C 漂洗 5 min。注：若非特异性杂交体较多，可以在此步增加洗涤时间、次数及调整杂交液中甲酰胺浓度。





- 2.11 滴加对应的信号探针：滴加含信号探针（见上表及附表）杂交液，稀释比 1: 200. 40° 孵育 3h. 后依次经过以下 SSC 洗涤：2×SSC, 40° C 洗 10min, 1×SSC, 40° C 洗 2×5min, 0.5×SSC 40° 洗 10min。
- 2.12 杂交：倾去预杂交液，滴加含探针杂交液，恒温箱杂交过夜。杂交条件见上表。
- 2.13 杂交后洗涤：洗去杂交液，2×SSC, 40° C 洗 10min, 1×SSC, 40° C 洗 2×5min, 0.5×SSC 室温洗 10min。若非特异杂交体较多，可以添加甲酰胺进行洗涤。
- 2.9 滴加对应的分支探针杂交：轻轻甩干切片，滴加已预热的相应的分支探针杂交液（见上表及附表）（60 μL），水平置于湿盒内 40℃ 杂交 45 min。此过程中在湿盒底部加入 50ml 2 × SSC，防止干片。
- 2.14 杂交后洗涤：倾去杂交液，将切片依次用 40° C 预热的 2× SSC、1× SSC、0.5× SSC、0.1× SSC 于 40° C 漂洗 5 min。注：若非特异性杂交体较多，可以在此步增加洗涤时间、次数及调整杂交液中甲酰胺浓度。
- 2.15 滴加对应的信号探针：滴加含信号探针（见上表及附表）杂交液，稀释比 1: 200. 40° 孵育 3h. 后依次经过以下 SSC 洗涤：2×SSC, 40° C 洗 10min, 1×SSC, 40° C 洗 2×5min, 0.5×SSC 40° 洗 10min。
- 2.16 杂交：倾去预杂交液，滴加含探针杂交液，恒温箱杂交过夜。杂交条件见上表。
- 2.17 杂交后洗涤：洗去杂交液，2×SSC, 40° C 洗 10min, 1×SSC, 40° C 洗 2×5min, 0.5×SSC 室温洗 10min。若非特异杂交体较多，可以添加甲酰胺进行洗涤。
- 2.18 滴加对应的分支探针杂交：轻轻甩干切片，滴加已预热的相应的分支探针杂交液（见上表及附表）（60 μL），水平置于湿盒内 40℃ 杂交 45 min。此过程中在湿盒底部加入 50ml 2 × SSC，防止干片。
- 2.19 杂交后洗涤：倾去杂交液，将切片依次用 40° C 预热的 2× SSC、1× SSC、0.5× SSC、0.1× SSC 于 40° C 漂洗 5 min。注：若非特异性杂交体较多，可以在此步增加洗涤时间、次数及调整杂交液中甲酰胺浓度。
- 2.20 滴加对应的信号探针：滴加含信号探针（见上表及附表）杂交液，稀释比 1: 200. 40° 孵育 3h. 后依次经过以下 SSC 洗涤：2×SSC, 40° C 洗 10min, 1×SSC, 40° C 洗 2×5min, 0.5×SSC 40° 洗 10min。
- 2.21.DAPI 复染核：切片滴加 DAPI 染液，避光孵育 8min，冲洗后滴加抗荧光淬灭封片剂封片。
- 2.22.镜检拍照：切片于尼康正置荧光显微镜下观察并采集图像。（紫外激发波长 330-380nm，发射波长 420nm,发蓝光；FAM(488)绿光激发波长 465-495nm，发射波长 515-555 nm，发绿光；CY3 红光激发波长 510-560，发射波长 590nm，发红光。CY5 激发波长 608-648nm，发射波长 672-712 nm，发粉光）

3. 技术原理介绍

采用 SweAMI 大技术，特异性的寡核苷酸经过加尾处理，作为探针。利用特定的分支探针作为中间杂交介质，能结合更多荧光信号探针形成更多的荧光标签。实现靶基因-探针杂交体的定位和定量。





4.结果判读

DAPI 染出来的细胞核在紫外的激发下为蓝色，阳性表达为相应荧光素标记的荧光。FAM(488)为绿光，cy3 为红光，CY5 为粉光。根据表达量不同荧光亮度有强弱。

注：上述涉及到的所有试剂，仪器等在 RNA 原位杂交实验时都需使用 DEPC 处理后的 Rnase free 环境。

仅供科研用途，不可用于临床诊断！

