

Y 染色体着丝粒检测试剂盒（荧光原位杂交法） 产品说明书

【产品名称】

通用名称：Y 染色体着丝粒检测试剂盒（荧光原位杂交法）

英文名称：CENY FISH Probe Kit

【包装规格】5 人份/盒、10 人份/盒、20 人份/盒

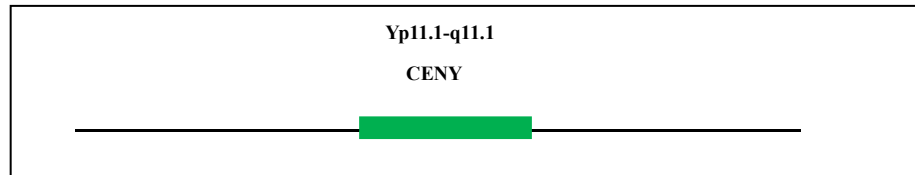
【预期用途】

荧光原位杂交探针主要用于检测与先天性疾病和癌症相关的染色体改变，辅助预测肿瘤治疗效果及预后，选择最有效的治疗方案，提高病人的生活质量和延长生命，覆盖病理学、遗传学和血液学的分子诊断领域，本产品用于 Y 染色体拷贝数的检测。

【检验原理】

FISH（荧光原位杂交）利用荧光标记的 DNA 探针与标本 DNA 上的互补区域杂交的一种分子检测技术，在荧光显微镜下，DNA 探针上的荧光基团在一定波长的激发光激发后会发出一定颜色的荧光信号，从而评价样本中基因状态，基本操作步骤包括：样本制备，样本预处理，DNA 和探针共变性和杂交，杂交后洗涤、复染、结果判读。

【探针设计模式图】



【主要组成成份】

名称	组成	规格	数量
CENY 探针	CENY 探针，绿色	50μl、100μl、200μl	1 管
染色液	DAPI、甘油等	75μl、150μl、300μl	1 管

试剂盒未提供但必需的实验试剂：无水乙醇、纯水、荧光原位杂交样品处理试剂盒（预处理液、酶缓冲液、胃蛋白酶、洗液 1、洗液 2）

【储存条件及有效期】

避光保存在-20℃±5℃，有效期 1 年。开瓶使用后不影响产品有效期；使用完毕后于-20℃±5℃保存，生产日期及有效期见标签。

【适用仪器】

本试剂盒结果分析在荧光显微镜下进行，探针选用绿荧光标记，以下是荧光的激发、发散波长信息：

绿色荧光：激发波长为 496nm，发散波长为 520nm

DAPI：激发波长为 340nm，发散波长为 488nm

【样本要求】

- 1、适用样本类型：外周血、骨髓。
- 2、载玻片：粘附载玻片。
- 3、样本采集：8-10ml 外周血或者 3-5ml 骨髓，注入肝素钠抗凝管中，防止凝固，样本量依病人具体情况而定，如再障的病人白细胞较少，应加大采集，（必要时，可进行细胞培养来扩大样本量）。

【样本处理】

（一）样本处理方法及制片

- 1、取 8-10ml 外周血或 3-5ml 骨髓，2000rpm 离心 10 分钟，外周血小心吸取中间的白沫层，骨髓小心除去上清液；
- 2、加 10ml 的 37℃预热低渗液（0.075mol/L 氯化钾溶液），吹打混匀，于 37±1℃水浴锅中水浴 30 分钟；
- 3、加 2ml 新制固定液（甲醇和冰乙酸按 3：1 的比例混合），轻轻混匀，然后 2000rpm 离心 8 分钟，弃去上清液，轻弹重悬；
- 4、缓慢加入 10ml 新制固定液，轻轻混匀，室温静置 8 分钟，2000rpm 离心 8 分钟，弃去上清液，轻弹重悬，进行固定，重复该步骤 2-3 次，直至细胞沉淀洗白洗干净；
- 5、加入适量的新制固定液，取一张干净的载玻片，取 3-5μl 细胞悬液滴加到载玻片上，室温下晾干；
- 6、用 10 倍物镜在显微镜下观察细胞密度，要求细胞无重叠，单个视野下有 100-200 个为宜。如果细胞密度及数目合适，继续下面的步骤；如果细胞有重叠，则再加入适量的新制固定液稀释细胞悬液，混匀后取 3-5μl 悬液观察；如果细胞密度低，则 2000rpm 离心 5 分钟小心吸去适量上清液，混匀后取 3-5μl 悬液观察；
- 7、将制备好的浓度适宜的细胞悬液，根据实验需求，制备相应数量的滴片，取干净的载玻片，取 3-5μl 混匀的细胞悬液滴加到载玻片上；
- 8、室温过夜老化或 56℃烘烤半小时；

【检验方法】

一、 试验前准备

（一） 试剂准备

- （1）胃蛋白酶工作液配制

实验开始前，打开恒温水浴锅，调节水温至 $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，取 50 ml 酶缓冲液于染缸中，并放入水浴锅，预热至缸内溶液温度为 $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 。酶消化前，先取 50mg 胃蛋白酶用 1ml 纯水溶解成 50mg/ml 的胃蛋白酶母液，然后取 100 μl 胃蛋白酶母液加入到 $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 的酶缓冲液中，充分溶解后，备用，剩余胃蛋白酶母液保存于 $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ 。

（2）洗液（次日准备）

在洗涤开始前，打开恒温水浴锅，调节水温至 $73\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，取 50 ml 洗液 1 于染缸中，并放入水浴锅，预热至缸内溶液温度为 $73\pm 1^{\circ}\text{C}$ ；另取 50 ml 洗液 2 于染缸中，室温放置。

二、实验步骤

（一）预处理

- 1、将玻片浸入室温的预处理液中，处理 10 分钟；
- 2、将玻片浸入 $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 胃蛋白酶工作液中消化 10 分钟；
- 3、将玻片浸入室温的预处理液中，处理 2 分钟；
- 4、玻片依次浸入 70%、85%、100% 的酒精溶液中脱水，各 1 分钟；
- 5、室温风干玻片；

（二）共变性及杂交（避光条件下进行）

- 1、用钻石笔在玻片背面画出样本区域；
- 2、将保湿条在纯水中浸润后放置在杂交仪的对应卡槽中，确保杂交仪表面干净无物；
- 3、打开杂交仪，设置或选择以保存的程序： 73°C 变性 3 分钟， 37°C 杂交过夜（16-20 小时）；
- 4、从 $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ 冰箱取出探针，震荡混匀，瞬时离心；
- 5、取 10 μl 探针，滴加到玻片的目标区域上，盖上盖玻片，注意避免气泡，并用封片胶密封盖玻片边缘；
- 6、将封好的玻片，放到杂交仪上，启动变性杂交程序；

（三）杂交后洗脱及复染（避光条件下进行）

- 1、杂交结束后，在杂交仪中取出玻片，去除封片胶与盖玻片；
- 2、将玻片浸入 $73\pm 1^{\circ}\text{C}$ 洗液 1 中，轻轻涮洗 2 分钟；
- 3、将玻片浸入室温洗液 2 中，洗涤 1 分钟；
- 4、将玻片浸入 70% 的酒精溶液中，洗涤 1 分钟；
- 5、将玻片取出，暗处自然干燥玻片；
- 6、加 10 μl 染色液至样本中心区域，盖上盖玻片并压紧，暗处 $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ 保存 20 分钟后在荧光显微镜下观察；

【FISH 结果观察】

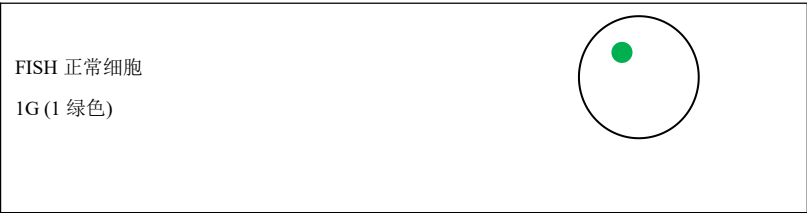
- 1、在荧光显微镜下选用合适的滤光片组观察结果；

2、在 10 $\times$ 物镜下寻找到区域，在 100 $\times$ 物镜下计数；

3、调整焦距，寻找合适的区域，要求细胞核边界完整，染色液染色均匀、核无重叠，信号点清晰；

4、在选择区域内，在核的不同层次找到所有信号点，对所有清晰的绿色信号进行计数；

常见信号类型判读



注：完成杂交的玻片置于 -20°C 避光储存。

【注意事项】

1. 本试剂盒仅用于科研。
2. 实验前请仔细阅读本说明书。
3. 请在有效期内使用。
4. 使用过的试剂和样本，应视为生物制品废弃物妥善处理。