

16S FISH 探针定制使用相关疑问解答

一、产品参数理解相关疑问

Q1: 冻干探针管上标注的“20D”是什么意思？如何快速换算成质量浓度？

A: ① “20D”是核酸类探针合成时的光密度值，为定量单位而非质量单位。（OD 即光密度， $10D \approx 40 \mu\text{g/mL dsDNA}$ ），

② 示例：若标注为“ $T_0 100 \mu\text{M}$ ，加 $50 \mu\text{L}$ ，总质量 $100 \mu\text{g}$ ，WM: 8000”

稀释到 $25 \mu\text{M}$ ：需加 $4 \times 50 \mu\text{L} = 200 \mu\text{L}$ 溶剂

质量浓度： $(100 \mu\text{g} \times 1000\text{ng}/\mu\text{g}) \div 200 \mu\text{L} = 500\text{ng}/\mu\text{L}$

Q2: 探针管上标注的“WM（分子量）”有什么实际用途？实验中需要用到这个数值吗？

A: 分子量是合成过程中计算“特定浓度所需溶剂体积”的核心依据，客户无需单独使用该数值，直接按标注的“ T_0 [目标浓度] μM ，加[X μL]”操作即可，无需自行二次计算。

二、稀释操作相关疑问

Q3: 探针稀释用无菌水还是 TE 缓冲液？两者对实验结果有影响吗？

A: 两者均可，但各有侧重：

无菌水：适合立即使用的探针（短期内使用完，如 1 周内使用）

TE 缓冲液（pH8.0）：含 Tris 和 EDTA，能稳定 pH 并螯合 Mg^{2+} ，显著延长探针稳定性，适合长期分装保存。

推荐方案：优先使用 TE 缓冲液，尤其是需多次使用的探针。

注意：TE 缓冲液需用 DEPC 水配制，避免 RNase 污染。

Q4: 稀释时加错了溶剂体积（比如多加/少加），能补救吗？

A: ① 少加溶剂（浓度偏高）：可根据“ $C_1V_1=C_2V_2$ ”补加溶剂

例如：应加 $200 \mu\text{L}$ 溶剂（目标 $25 \mu\text{M}$ ），实际加了 $150 \mu\text{L}$ ，需补加溶剂体积 = $(25 \times 200 - 25 \times 150) / 25 = 50 \mu\text{L}$ （补加后总体积 $200 \mu\text{L}$ ，浓度恢复 $25 \mu\text{M}$ ）；

② 多加溶剂（浓度偏低）：无法补救，因探针总质量固定，多加的溶剂会稀释总浓度，且无法分离多余溶剂，需重新合成探针或使用备用分装液重新稀释。

Q5: 稀释探针时，溶剂加完后需要怎么处理？是否需要离心或剧烈震荡？

A: ① 加完溶剂后，轻轻颠倒离心管数次混匀即可，禁止剧烈震荡（避免破坏探针的核酸链结构和荧光基团）；

② 无需额外离心，若探针未完全溶解，可在室温避光静置 5-10 分钟，再轻轻颠倒混匀，直至完全溶解（冻干探针溶解需要一定时间）。

三、浓度换算相关疑问

Q6: 如何将 25 μM 的存储液稀释到 FISH 试剂盒要求的 10~15ng/ μL 工作浓度?

A: 换算公式:

质量浓度 (ng/ μL) = 摩尔浓度 (μM) \times 分子量 (Da) $\times 10^{-3}$

示例: 探针分子量 WM=8000Da, 说明书标注稀释为 25 μM

存储液浓度=25 \times 8000 \div 1000=200ng/ μL

试剂盒要求 10~15ng/ μL , WM=8000Da

10ng/ μL 对应的摩尔浓度=10 \times 1000 \div 8000=1.25 μM

15ng/ μL 对应的摩尔浓度=15 \times 1000 \div 8000=1.875 μM

您需要将 25 μM 的存储液稀释 13~20 倍 (25 \div 1.25=20, 25 \div 1.875 \approx 13)

四、保存条件相关疑问

Q7: 探针稀释后分装, 每次取用时如何防止反复冻融和荧光淬灭?

A: 反复冻融是导致探针降解和信号衰减的首要原因, 分装操作建议:

1. 首次稀释: 按 4X 体积稀释至 25 μM 后, 立即分装为 5-10 μL /管 (单次用量);
2. 保存: 分装后用锡纸包裹离心管, -20 $^{\circ}\text{C}$ 避光, 避免放入自动除霜冰箱的冷冻层;
3. 取用: 每次取 1 管, 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光当天用完, 尽量当日使用完; 若单管未用完, 用铝箔严密包裹后放 4 $^{\circ}\text{C}$, 24h 内用完, 严禁二次冻存。

Q8: 为什么推荐将探针稀释到 25 μM 作为存储浓度, 而不是直接用 100 μM 存储或使用?

A: 25 μM 是兼顾“稳定性”和“使用便利性”的最优存储浓度, 在-20 $^{\circ}\text{C}$ (短期) 或-80 $^{\circ}\text{C}$ (长期) 保存时, 可显著延长探针的活性有效期。100 μM 浓度过高长期冻存容易发生分子间聚集甚至微量沉淀, 导致有效浓度下降。