

FISH 检测试剂盒使用疑问解答

一、试剂盒储存与组成相关疑问

Q1: 3 种浓度的 Hybridization Buffer (20%/30%/40%) 该如何选择? 没有明确方向, 完全需要盲目摸索吗?

A: 浓度选择取决于样本类型和探针特性, 以下选择可供参考:

20%: 适合细菌涂片、细胞悬液等简单样本 (即样本中目标细菌含量较高)

30%: 通用起始浓度, 推荐首次测试使用, 适用于大部分组织切片和常规探针

40%: 适合复杂组织基质 (如肠道组织)、富含黏液的样本, 或需要严格杂交条件的探针 (高浓度杂交液可提升特异性), 样本中细菌丰度低或土壤/污泥样本 (易出现非特异性杂交) 可尝试 40% 浓度。

Q2: Washing Buffer (10×) 稀释前是浑浊白色, 稀释后澄清有少量泡沫, 这是正常现象吗? 若稀释前未摇匀会有什么影响?

A: 属于正常现象。Washing Buffer 是浓缩缓冲盐溶液, 长期静置后溶质会沉降分层。

说明书明确标注“稀释前必须摇匀, 摇匀后呈浑浊白色液态, 稀释后变澄清且有少量泡沫”, 操作建议: 使用前剧烈摇晃 1-2 分钟, 确保护壁无结晶残留 (必要时可低温加热)。稀释后泡沫属正常现象, 不影响性能。

若稀释前未摇匀, 会导致 Washing Buffer 中有效成分分布不均, 后续洗涤时无法充分去除未结合的探针, 可能造成荧光背景偏高, 影响检测结果准确性。

Q3: DAPI-Antifade Solution 不小心见光了还能使用吗? -20℃ 避光储存的要求是否必须严格遵守?

A: ①若短时间 (如 10 分钟内) 见光, 可继续使用, 但荧光信号可能略有衰减; 若长时间暴露在强光下 (如半小时以上), 不建议使用, 因 DAPI 荧光基团对光敏感, 见光易淬灭, 会导致后续染色效果变差。

② 必须严格遵守 -20℃ 避光储存要求, 否则会加速荧光基团降解, 直接影响最终镜检时的荧光信号强度。

Q4: FISH 封片剂的“指示效果”具体是指什么?

A: 该封片剂的核心功能是:

物理隔绝: 杂交期间防止 Hybridization Buffer 蒸发, 维持湿润环境。

化学保护: 含特殊保湿成分, 避免盖玻片下液体干涸导致探针局部浓度过高。

操作指示: 其颜色标记便于识别封片位置, 移除时不易残留。

该染色剂不与细菌或探针发生相互作用, 因此不会干扰检测结果。

二、自备物品相关疑问

Q5: FISH 荧光探针浓度范围只能是 10~15 ng/μL 吗?

A: 浓度建议控制在 10~15 ng/μL: 浓度过低会导致杂交信号弱, 难以检测; 浓度过高易引发非特异性结合, 增加背景荧光,

探针浓度与杂交时间成反比关系, 高浓度需缩短时间防止非特异性结合。

Q6: 二甲苯的替代品有哪些? 有没有推荐的安全替代品?

A: 可选择常用的环保脱蜡剂(如柠檬烯脱蜡剂、植物源脱蜡液等), 但需满足以下要求:

- ① 脱蜡效果与二甲苯相当, 能彻底去除石蜡切片中的石蜡成分;
- ② 不影响后续探针杂交和荧光信号。

使用前建议先做小样本验证, 确认脱蜡后样本组织形态完整、无损伤。

Q7: 没有现成的避光湿盒, 该如何自制?

A: ①密封性好的塑料盒或培养皿, 底部铺一层浸湿的滤纸(注意保持湿度, 避免干涸);

② 用锡纸将盒子整体包裹(实现避光作用);

③ 放入样本玻片时, 确保玻片水平放置, 避免杂交液流淌。

注意: 湿盒内湿度需充足, 杂交过程中不可打开锡纸(防止强光照射)。

三、实验操作相关疑问

Q8: 不同类型样本的预处理(烤片、脱蜡)时间/温度是否有相关的调整建议?

A: 预处理的核心是“去除杂质、固定样本形态”, 参考建议:

样本类型	调整建议
老化石蜡切片	脱蜡时间可延长至 8 分钟/次(3 次), 后续乙醇梯度脱水时间不变; 若脱蜡后组织仍有蜡迹, 可增加 1 次二甲苯脱蜡。
冰冻切片 >10 μm	厚切片(>10 μm) 烤片温度选 65-68℃, 时间延长至 1-2h(避免样本脱落); 薄切片(<3 μm) 选 70-72℃, 时间 0.5-1h
土壤/活性 污泥涂片	烤片时间可缩短至 1.5h(若涂片较厚)或延长至 2.5h(若涂片松散), 温度保持 72℃不变

Q9: Solution A 和 Solution B 的处理时间如何根据具体样本进行调整?

A: 调整基本原则“样本越厚、老化程度越高, 处理时间越长”, 调整参考建议:

Solution A (37℃): 薄标本(如薄冰冻切片、细胞涂片)保持 10-15min; 厚标本(如厚石蜡切片、土壤涂片)延长至 15-20min。

Solution B (37℃): 常规样本 15-20min; 厚标本或老化标本延长至 20-25min; 若样本中细菌细胞壁较厚(如革兰氏阳性菌为主), 可按 25-30min 处理。

Q10: 杂交过夜时间范围 18-72h 差异大, 如何确定最佳时长?

A: 调整基本原则是“样本菌体含量越少、复杂程度越高, 杂交时间越长”, 参考建议:

常规样本(新鲜组织、活跃菌群涂片) 18-24h 即可;

低丰度细菌样本(如罕见菌检测、低污染样本)可延长至 48h;

极难杂交的样本(如休眠细菌、厚壁菌)可延长至 72h, 无需担心“过度杂交”(本试剂盒杂交体系稳定性强, 72h 内不会出现非特异性过度结合)。

Q11: 洗涤时盖玻片 3-5min 未自动脱落, 能手动取下吗? Washing Buffer 工作液未预热到 37°C, 会有影响吗?

A: ①不建议手动取下, 手动取盖玻片易刮伤样本组织或蹭掉已结合的探针, 若 3-5min 未脱落, 可将玻片在 1×Washing Buffer 工作液中轻轻晃动 1-2 次, 促进盖玻片脱落, 仍未脱落则延长浸泡时间至 5-8min;

②有影响: Washing Buffer 工作液预热至 37°C 是为了维持杂交后的稳定环境, 有效去除未结合的探针; 若温度过低(如室温 25°C 以下), 未结合的探针难以脱离, 会导致背景荧光偏高, 因此需将工作液预热至 37°C 再使用。

Q12: DAPI-Antifade Solution 滴加后静置 15min, 若时间不够会怎样? 滴加多少合适?

A: ①静置时间不够会导致 DAPI 染色不充分, 细菌细胞核荧光信号弱, 难以观察到细菌的定位; 若已不足 15min, 可在暗处补静置 5min 后再镜检;

②滴加量以“刚好覆盖样本表面”为宜, 无需过多(避免溢出浪费), 也不能过少(未覆盖区域无法染色), 滴加后立即盖盖玻片(避免见光)。

四、结果分析类

Q13: 背景荧光过强, 如何区分是自发荧光还是非特异性杂交?

A: 自发荧光: 全通道均匀高亮, 无探针的阴性对照也出现, 常见于肠道组织、土壤样本中。

非特异性杂交: 特定探针荧光通道出现点状或片状信号, 阴性对照无此现象。

操作建议: 实验过程中增加空白对照(无探针)检测, 用于排除是否为样本自发荧光情况。