

FISH 原位杂交试剂盒(CY3)**货号 C004****原 理:**

原位杂交技术 (in situ hybridization) 是以标记的核酸分子为探针, 在组织细胞原位检测特异核酸分子的技术。使含有特异序列、经过标记的核酸单链即探针, 在适宜条件下与组织细胞中的互补核酸单链即靶核酸发生杂交, 再以放射自显影或免疫细胞化学方法对标记探针进行探测, 从而在细胞原位显示特异的 DNA 或 RNA 分子。

本试剂盒使用敏感性加强型原位杂交检测方法, 具有灵敏性强, 杂交效率高, 背景清晰, 结果可靠的优点。可以检测常规福尔马林固定, 石蜡包埋的标本。

试剂盒组成:

产品编号	产品名称	包装	保存温度
C004A	10X 蛋白酶 K	2ml	-20℃
C004B	预杂交液	20ml	-20℃
C004E	乙酸酐	5ml	2-8℃
C001F	三乙醇胺水溶液 pH8.0	100ml	2-8℃
C001G	20XSSC pH4.5	30ml	2-8℃
C001H	20XSSC pH7.5	30ml	2-8℃

自备试剂:

DEPC、乙酸酐、原位杂交用 PBS、RNA Free4%PFA、甘氨酸、甲酰胺、盐酸、二甲苯、乙醇、DAPI、防淬灭封片剂、指甲油、湿盒、杂交仪、鼓风干燥箱、切片机、漂片机、染缸、枪头、移液器、口罩、手套。

保存温度: -20℃ 6个月有效

实验流程:**一. 细胞爬片或者冰冻切片**

1. 冰冻切片厚度 5-8um, 用放脱片载玻片; 细胞爬片的盖玻片要用多聚赖氨酸处理。防止脱片。
2. 细胞爬片或冰冻切片均可用下述方法固定: 用 RNA Free4%多聚甲醛室温固定 20-30min, 用 DEPC 水充分水洗, 自然干燥后-20℃冷冻可保存 2 周以上。
3. 制作湿盒: 用 5×SSC(PH:7.5) (35ml) + 甲酰胺 (35ml) 置于湿盒内。
4. 30% H_2O_2 1 份+9 份纯甲醇混合液室温处理 10min。DEPC 水洗 3 次, 每次 1min;
5. 切片置于湿盒内, 用 0.25%盐酸滴于组织上, 常温 15min, 用 DEPC 水洗 2 次, 每次 1min (盐酸可中和带电荷的碱性蛋白, 降低背景)
6. 蛋白酶 K 覆盖组织, 分子杂交仪中 37℃20min。蛋白酶 K 可以消化和暴露被遮蔽的靶核酸, 增加探针的结合效率。
7. 用 0.2%或 0.1mol/L 甘氨酸洗液洗 1min (现用现配), 终止蛋白酶 K。

8. PBS 洗两次, 每次一分钟。
9. 用 4%PFA 多聚甲醛固定组织 10min。
10. PBS 洗三次, 每次 1min。
11. 用 acetic anhydride 乙酸酐 pH=8.0 (乙酰化作用, 降低背景) 室温洗 5min, 2 次。(乙酸酐溶液配制: 每 50ml 三乙醇胺水溶液中加 126ul 乙酸酐, 现用现配, 按比例配制, 用多少配多少)。
12. 用 PBS 洗 5 次, 每次 1min。
13. 用 5×SSC pH7.5 洗两次, 每次 1min。
14. 切片放置湿盒内, 用预杂交液 覆盖组织, 65℃ 预杂交 1h。
15. 500ng/ml Cy3-labeled probe 探针覆盖切片, 在杂交仪内 62-70℃ 黑暗反应 24~72h, 反应温度与反应时间视不同的组织与探针而定, 建议一般 65℃ 48h。
16. 用 2×SSC pH=7.5, 室温洗 1 次, 1min。
17. 用甲酰胺 加 4×SSC pH=4.5 1:1 混合液在 60℃ 或 65℃ 洗三次, 每次 20min。
18. 用 PBS 洗 5 次, 每次 1min, 室温。
19. DAPI 染核, PBS 洗 3 遍, 每遍 5min。
20. 滴加防淬灭剂, 盖盖玻片。指甲油封片, 荧光显微镜或激光共聚焦显微镜观察。

二. 石蜡切片

如果有条件的话, 尽可能采用新鲜标本, 及时固定。固定液一定要用 RNA Free PFA 固定液固定, 固定时间为 1 小时, 较大标本不超过 2 小时。标本较大时用锋利刀片切成厚度不超过 4mm 的小块。动物大脑固定时间 30-40min, 一般不超过 1 小时。

1. 常规脱蜡至水洗。
2. 按照细胞爬片和冰冻切片实验流程 3 步开始操作。

注意事项:

1. 本试剂盒实验流程中的所有水试剂均用 DEPC 水配制;
2. 取新鲜标本做冰冻切片前一定要用 DEPC 水配制的 10%蔗糖溶液在 4℃ 冰箱中浸泡过夜, 再换用 DEPC 水配制的 30%蔗糖溶液在 4℃ 冰箱中浸泡过夜. 然后 -80℃ 冰箱保存或者直接冰冻切片。
3. 由于特定的 mRNA 序列仅占总序列的极少数, 因此原位杂交容易出现非特异性染色, 一般通过用不加探针或阴性标本作阴性对照, 基本可以确定是否是非特异性染色。如果有明显的非特异性染色现象, 可以用预杂交液稀释探针 (一般稀释 10 倍就行), 并应加强探针杂交后的洗涤。如果染色部位有出入, 往往和标本固定时间过长有关, 应重新处理标本。
4. 本试剂盒虽然操作步骤多, 繁琐. 但是背景干净, 非特异染色少! 是 SCI 文章通用的经典方法. 可以适用长链的 cRNA 探针。
5. 试剂盒中的封闭液不可以用 5%BSA 或 2%山羊血清代替。
6. Cy3 吸收光 550nm, 激发光 570nm。