

EGFR 原位杂交试剂盒**货号 C005****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。

EGF 是体内一种重要的细胞因子, 在一系列生理和病理过程中起重要作用。EGF 通过其受体发挥作用。本试剂盒采用多相寡聚核苷酸探针, 敏感性和杂交效率有明显提高!

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。

EGFR 靶基因的 mRNA 序列为:

- 1) 5'—TACAA CCCCA CCACG TACCA GATGG ATGTG—3'
- 2) 5'—ACAGA CTCCA ACTTC TACCG TGCCC TGATG—3'
- 3) 5'—CCCTG ACTAC CAGCA GGACT TCTTT CCCAA—3'

适用: 人、大鼠、小鼠组织和细胞。

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	2ml	-20℃
C004D	探针	1 支	-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℃
C001I	生物素化鼠抗地高辛	5ml	-20℃
C001J	SABC-POD	5ml	2-8℃
C001K	生物素过氧化物酶	5ml	-20℃

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：请严格按照说明书上的保存温度保存 有效期：6 个月

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×SSCpH7.5 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 digoxigenin-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. 将切片置于湿盒内, 用封闭液覆盖切片, 室温反应至少 30min。
20. 滴加生物素化鼠抗地高辛抗体, 37℃60min 反应, PBS 洗 3 遍, 每遍 5min。
21. 滴加 SABC, 37℃20min 反应, PBS 洗 3 遍, 每遍 5min。
22. 滴加生物素化过氧化物酶, 37℃20min 反应, PBS 洗 3 遍, 每遍 5min。
23. DAB 显色, 充分水洗, 必要时苏木素染核, 酒精脱水, 二甲苯透明。封片。

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。