

WISH 原位杂交试剂盒说明书**货号 WISH04****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的原位杂交检测方法, 具有灵敏性强, 杂交效率高, 背景清晰, 结果可靠的优点. 用以检测小组织样本的整体杂交。

本试剂盒适用于 digoxigenin-labeled probe 探针的整体原位杂交。

试剂盒组成:

产品编号	产品名称	包装	保存温度
WISH04A	10X 蛋白酶 K	5ml	-20℃
WISH04B	预杂交液	30ml	-20℃
WISH04C	L1 buffer	100ml	-20℃
WISH04D	L2 buffer	100ml	-20℃
WISH04E	L3 buffer	100ml	-20℃
WISH04F	H1 buffer	100ml	-20℃
WISH04G	RNase 母液	1ml	-20℃
WISH04H	RNase 稀释液	100ml	-20℃
WISH04I	Tris/NaCl 溶液	100ml	-20℃
WISH04J	20XSSC pH4.5	30ml	-20℃
WISH04K	封闭液	20ml	-20℃
WISH04L	生物素化鼠抗地高辛抗体	5ml	4℃
WISH04M	NTM buffer	100ml	-20℃
WISH04N	NBT 储存液	1ml	-20℃
WISH04O	BCIP 储存液	1ml	-20℃
WISH04P	1 M 左旋咪唑	1ml	-20℃

自备试剂:

DEPC 水、原位杂交用 PBS、RNA Free4%PFA、、乙醇、DAPI、防淬灭封片剂、、离心管、

杂交仪、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：**3 个月

实验流程：

1. 标本梯度酒精脱水（用DEPC水分别配制50%、60%、70%、80%、90%酒精依次处理样本，分别30min;100%酒精2次，每次30min）；
2. 标本用DEPC-PBST（0.1%Tween-20）水化1h;
3. 用DEPC-PBST配制6% H_2O_2 漂白1h，冰上操作或者放4℃冰箱；
4. DEPC-PBST洗涤3次，每次5min；
5. 配制1X Proteinase K 37℃通透20min；
6. 用DEPC-PBST洗涤3次，每次5min；
7. 用原位杂交专用PFA室温二次固定20min；
8. 用DEPC-PBST（0.1%Tween20）洗涤3次，每次5min；
9. 标本用预杂交液68℃孵育60min；
10. 用预杂交液稀释Digoxigenin标记的探针，孵育标本，68℃孵育48h；
11. 用预热的L1 Buffer 68℃洗涤3次，每次30min；
12. 用H1洗液68℃洗涤3次，每次10min；
13. 用L2 Buffer 68℃洗涤3次，每次10min；
14. 用L3 Buffer和RNase Buffer 1:1混合液室温洗涤5min，
15. 用RNase Buffer按照1:100稀释RNase母液，用稀释后的母液37℃处理标本1h；
16. 用Tris/NaCl溶液室温洗涤3次，每次5min，充分洗掉RNase溶液；
17. 用封闭液孵育样本，室温2h或者37℃1h；

18. 用生物素化鼠抗地高辛抗体孵育样本，4℃过夜；
19. 用PBST洗3遍，每次5min；
20. 用NTM buffer洗 3 遍，每遍5min；
- 21.用NBT/BCIP染色液浸染，室温避光反应10min（不同的样本可能显色时间不同，需要隔时间观察）PBST洗 3 遍，每遍 5min；
22. 短时间样本可以放PBST溶液中4℃保存，体视显微镜拍照；长期保存可以放4%PFA中4℃保存。

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. 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。
3. 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。
4. 整体原位杂交实验流程长，要注意的细节特别多，规范的实验操作特别重要。
5. 由于实验难度特别大，请注意多收集样本，实验可能有反复。
6. **NBT/BCIP 染色液配制：10ml NTM buffer 加 25ul 1M 左旋咪唑加 333ul NBT 储存液加 35ul BCIP 储存液，混合即可。现配现用。**