

**WISH 原位杂交试剂盒说明书****货号 WISH05****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。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
WISH05A	10X 蛋白酶 K	5ml	-20℃
WISH05B	预杂交液	50ml	-20℃
WISH05C	MAB buffer	500ml	4℃
WISH05D	封闭液	30ml	-20℃
WISH05E	9.5T buffer	50ml	-20℃
WISH05F	BM purple	25ul	-20℃
WISH05G	抗 Dig 抗体	10ul	-20℃

**自备试剂:**

DEPC 水、原位杂交用 PBS、RNA Free 4%PFA、乙醇、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; 配制试剂用的 PBST 一定用无 RNA 酶的 PBS

**有效期:** 3 个月

1 L MAB 溶液中加入 1 mL Tween-20 使其终浓度为 0.1% (v/v) 即为 MABT;

1L PBS 溶液中加入 1 mL Tween-20 使其终浓度为 0.1% (v/v) 即为 PBST;

**样本固定**

取目标时期的样本用 RNAFREE PFA 固定液固定 1-12h(最好不要超过 12h, 对比实验证明

超过 12h 对杂交信号有影响), 然后去除固定液, 将样本转移到无水甲醇中长时间 4 度保存

(请选择适当的容器, 建议用 5ml 的青霉素瓶为最佳, 或者用 5ml 离心管) 并贴好不容易被甲醇溶解的标签。

#### 实验流程:

#### 实验流程

1. 用 75%、50%、25%的甲醇/PBST 浸泡样本, 使样本复水, 每次 10min;
2. PBST 浸洗 1 次, 3min;
3. 用-20 度冰丙酮处理 10min, 增加膜通透性;
4. PBST 洗 3 次, 每次 10min, 以去除丙酮;
5. 用 PBST 1:1000 稀释 Proteinase K, 37°C 对样本进行消化。消化时间参照斑马鱼:  
**受精后 0 to 10h 1 min; 受精后 12 to 14h 3 min; 受精后 15 to 18h 5 min; 受精后 18 to 28h 10 min; 受精后 28 h to 2d 25 min; 受精后 2d to 3d 45 min**
6. 快速用 PBST 浸洗 2 次, 终止 Proteinase K;
7. PBST 洗 3 次, 每次 20min;
8. 加入预杂交液 65°C 预杂交 2-5h;
9. 将预杂交液中加适量探针即为杂交液 (探针浓度视不同样本而不同, 需要摸索), 杂交液孵育样本加热到 80°C 5min 立即放入冰中变性;
10. 去除杂交液, 换新杂交液 65°C 杂交过夜;
11. 分别用 100%、75%、50%、25% 预杂交液/2XSSC 65°C 浸洗 20min, 2XSSC 65°C 浸洗 20min 1 次, 0.2XSSC 65°C 浸洗 20min 3 次;
12. 分别用 75%、50%、25% MABT 室温浸洗 10min, MABT 室温浸洗 10min;

13. 加适量封闭液室温封闭 1h;
  14. 加适量抗 Dig 一抗 (1:3000) 4℃过夜;
  15. 用 MABT 室温浸洗 6 次, 每次 10min;
  16. 用 9.5T Buffer 浸洗 2 次, 每次 10min;
  17. 加适量 BM(BM purple: 9.5T Buffer= 1:1)进行染色; 染色时间视样本大小而定, 一般斑马鱼 40min。
  18. 加 PFA 固定至少 20min 以终止显色;
  19. 加 PBST 浸洗 3 次, 每次 5min, 以去除 PFA 固定液;
  20. 样本短时间 4℃保存可以直接放在 PBST 中, 长期保存可以用 PBST/Glycerol 4℃保存。
- 请及时拍照。

**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。