

WISH 原位杂交试剂盒说明书**货号 WISH06****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
WISH06A	10X 蛋白酶 K	5ml	-20℃
WISH06B	预杂交液	50ml	-20℃
WISH06C	MAB buffer	500ml	4℃
WISH06D	封闭液	30ml	-20℃
WISH06E	TSA buffer	20ml	-20℃
WISH06F	荧光染料	25ul	-20℃
WISH06G	抗 Dig 抗体	10ul	-20℃
WISH06F	HRP Streptavidin	10ul	-20℃

自备试剂:

DEPC 水、原位杂交用 PBS、RNA Free4%PFA、乙醇、3% H_2O_2 、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:

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℃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℃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℃5min 立即放入冰中变性;
10. 去除杂交液, 换新杂交液 65℃杂交过夜;
11. 分别用 100%、75%、50%、25%预杂交液/2XSSC 65℃浸洗 20min, 2XSSC65℃浸洗 20min1 次, 0.2XSSC65℃浸洗 20min3 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 (1:2000) 4℃ 过夜;
15. 用 MABT 室温浸洗 6 次, 每次 10min;
16. 滴加 HRP Streptavidin (1:500) 室温孵育 30min。PBS 洗 3 次, 每次 5min;
17. TSA Buffer 浸洗 10min 一次;
18. 荧光染料工作液 (荧光染料工作液: 1ml TSA Buffer+0.3% H₂O₂ 10ul+2ul 荧光染料)

进行染色; 染色时间视样本大小而定, 一般斑马鱼 20min。
19. 加 PBST 浸洗 3 次, 每次 5min;
20. 用 PBS 稀释 DAPI, 染核 10min;
21. 用 PBS 浸洗 3 次, 每次 10min, 洗掉多余的 DAPI;
22. 样本短时间 4℃ 保存可以直接放在 PBST 中避光保存, 长期保存可以用

PBST/Glycerol 4℃ 避光保存。请及时荧光拍照或荧光扫片。

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. 由于实验难度较大, 请注意多收集样本, 实验可能有反复。