

FISH 原位杂交试剂盒说明书**货号 C008****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, 具有剪感性强, 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
C007A	10X 蛋白酶 K	2ml	-20℃
C007B	预杂交液	20ml	-20℃
C007C	乙酸酐	5ml	2-8℃
C007D	0.25% 盐酸溶液	15ml	2-8℃
C007E	甲酰胺	50ml	2-8℃
C007F	三乙醇胺水溶液 pH8.0	100ml	2-8℃
C007G	20XSSC pH4.5	15ml	2-8℃
C007H	20XSSC pH7.5	15ml	2-8℃
C007I	DAPI	10ul	-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, 用防脱片载玻片; 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%H₂O₂1 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°C 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入 126ul 乙酸酐, 现用现配, 按比例配制, 用多少配多少)。用 PBS 洗 5 次, 每次 1min。
12. 用 5×SSC pH7.5 洗两次, 每次 1min。
13. 切片放置湿盒内, 用预杂交液覆盖组织, 65°C 预杂交 1h。

DNA 原位杂交请操作此步:

预杂交之后, 杂交前, 将覆盖有杂交液(内含探针)的组织切片在 95°C 反应 10min, 使探针和组织 DNA 变性, 即变成单链后, 迅速置于冰上 1min, 再置于杂交仪内杂交 24-72h。

14. 100u M 的探针母液可以 1:500—1000 稀释, probe 探针覆盖切片, 在杂交仪内 62-70°C 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°C 48h。
15. 用 2×SSC pH=7.5, 室温洗 1 次, 1min。
16. 用甲酰胺加 4×SSC pH=4.5 1:1 混合液在 60°C 或 65°C 洗三次, 每次 20min。
17. 用 PBS 洗 5 次, 每次 1min, 室温。
18. 用 DEPC 处理水 1000 倍稀释 DAPI, 染核 5min。
19. 用 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°C 冰箱中浸泡过夜, 再换用 DEPC 水配制的 30% 蔗糖溶液在 4°C 冰箱中浸泡过夜. 然后 -80°C 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。