

FISH-TSA 原位杂交试剂盒说明书**货号 C009-TSA F488****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。酪胺信号放大系统 (Tyramide Signal Amplification, TSA) 是一种用于检测低丰度或者低表达靶标的信号放大技术。TSA 技术可以将检测灵敏度提供 50-200 倍。

偶联有辣根过氧化物酶 (HRP) 的二抗和一抗结合后, 将邻近区域的荧光染料分子的酪胺基团活化, 活化后的染料分子可与靶标分子及靶标分子周围的芳香类氨基酸残基 (如酪氨酸、色氨酸、苯丙氨酸等) 共价结合并聚集, 从而在靶标区域形成高密度荧光信号。由此实现对低丰度靶标分子的检测和荧光成像。

本试剂盒使用敏感性加强型原位杂交检测方法, 具有敏感性强, 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	保存温度	包装
C001A	10X 蛋白酶 K	-20℃	2ml
C001B	预杂交液	-20℃	15ml
C001C	封闭液	-20℃	5ml
C001D	生物素化鼠抗地高辛	4℃	2ml
C001E	辣根过氧化物酶标记链霉亲和素溶液	4℃	2ml
C001F	20XSSC (PH:4.5)	4℃	30ml
C001G1	20XSSC (PH:7.5)	4℃	30ml
C001G2	三乙醇胺水溶液	4℃	50ml
TSA01-2	TSA Buffer	4℃	20ml
TSA01-3	0.3% H ₂ O ₂	4℃	2ml



F480-TSA	F488 Tyramide 荧光染料	-20℃	30ul
----------	--------------------	------	------

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、苏木素、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: -20℃ 6 个月有效

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 值: 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)。用 PBS 洗 5 次, 每次 1min。
12. 用 PBS 洗 5 次, 每次 1min。
13. 用 5×SSCpH=7.5 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. 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. 滴加辣根过氧化物酶标记链霉亲和素溶液，37℃20min 反应，PBS 洗 3 遍，每遍 5min。
22. 滴加 TSA 染色溶液，37℃10min 反应，

TSA 反应液	试剂名称	体积
F488 Tyramide 荧光染料反应液	TSA Buffer	1ml
	0.3% H ₂ O ₂	10ul
	F488 Tyramide 荧光染料	2ul

PBS 洗 3 遍，每遍 5min。

23. DAPI 染核，充分水洗，荧光淬灭剂封片。

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.