



## 通用型生物素探针用原位杂交试剂盒 (HRP 检测系统)

### 一、简介

本公司通用型杂交原位杂交检测试剂盒依探针标记分为：地高辛标记探针用原位杂交检测试剂盒(HRP/AP 检测系统)、生物素原位杂交检测试剂盒(HRP/AP 检测系统)。

产品名称	显色系统	产品编号
通用型生物素探针原位杂交试剂盒	HRP 显色系统	ISH-BH1

### 二、试剂盒组成

a) 蛋白酶 K 溶液	6ml/120T
b) 预杂交液	6ml/120T
c) 杂交液	6ml/120T
d) 封闭液	6ml/120T
e) 过氧化物酶标记链亲和素 (HRP-SP)	6ml/120T

### 三、标本制备

#### 一) 取材

- 1、组织应尽可能新鲜，一般新鲜组织和培养细胞应在 30min 内固定。
- 2、所用器械、容器都要经高压消毒，或清洁后用 DEPC 处理水清洗。
- 3、要避免用 RNA 酶很丰富的手指直接接触组织、器械、容器和溶液等。

#### 二) 固定

- 1、进行原位杂交时，组织常需用化学固定剂及时的固定。其目的在于避免组织中核酸的降解，保存组织的形态结构，以及增加组织的通透性。
- 2、对新鲜组织的冰冻切片或细胞培养标本先用 0.5~1%多聚甲醛固定 1min, 随后再用 70%酒精固定 1min (须在固定液中加入 0.1%DEPC 处理，以抑制 RNA 酶对 mRNA 的分解作用)。
- 3、在大多数情况下，4%多聚甲醛都可获得较好的原位杂交结果。因此实验中要选用各种固定剂时，可首先选用 4%多聚甲醛。选用 4%多聚甲醛做固定剂，鼎国生物实验室推荐细胞室温固定 30min; 组织室温固定 1 小时。



### 三) 切片

- 1、常用的原位杂交标本有石蜡切片、冰冻切片和细胞培养标本。
- 2、所用的载玻片要清洗干净，使其不含 RNA 酶。为防止组织或细胞标本在杂交过程中脱落，载玻片要用粘片剂(多聚赖氨酸或 APES)处理。(鼎国生物有售粘片剂及处理好的原位杂交专用玻片)。
- 3、切片厚度可根据具体情况而定。如果靶组织中待测 mRNA 的量较少，所采用的原位杂交技术敏感性较低，为了能在局部得到较多的信号，切片可厚一些(约 10~15 $\mu\text{m}$ )；反之，切片则可薄一些(约 5~7 $\mu\text{m}$ )。
- 4、制备石蜡切片，展片时要用含 0.04% DEPC 双蒸水，一般都要用加温台展片。制成的石蜡切片置于 52 $^{\circ}\text{C}$ 烤箱过夜，随即可用来做原位杂交。经烤干的切片也可以室温下保存。
- 5、冰冻切片置 37 $^{\circ}\text{C}$ 干燥 4 小时或过夜后，即可进行原位杂交。也可将切片放在盛有干燥剂的密闭容器内 -70 $^{\circ}\text{C}$  保存一年，或将切片浸在 70%酒精内 4 $^{\circ}\text{C}$  保存一年。
- 6、培养细胞标本采用爬片法制备。标本经空气干燥 1~2 分钟，浸渍固定，PBS 洗两次，5min/次；再用热蒸馏水洗 2 次，5min/次。置 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱 4 小时或过夜，标本即可进行原位杂交。也可于 -70 $^{\circ}\text{C}$ 干燥保存或 70%乙醇 4 $^{\circ}\text{C}$  保存。

### 四、杂交检测操作步骤

#### 一) 标本预处理

细胞爬片	固定液：4% 多聚甲醛 (pH7.4 PBS 溶液配制) 室温固定 30min。0.01M PBS 洗 3 次，5min/次。 渗透液：0.1% Triton X-100 (0.1%柠檬酸钠溶液配制) 冰浴 2-10min。
石蜡组织切片	二甲苯和梯度乙醇 100%、95%、75%、50%，常规脱蜡入水。 10-20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 蛋白酶 K 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 5~30min (可根据标本新旧厚薄调整消化时间)。
冰冻组织切片	固定液：4% 多聚甲醛 (pH7.4 PBS 溶液配制) 室温固定 30min。0.01M PBS 洗 3 次，5min/次。 渗透液：0.1% Triton X-100 (0.1%柠檬酸钠溶液配制) 冰浴 2-10min。

#### 二) 杂交及检测

##### 1、RNA 原位杂交

- 1) 新鲜配制 0.5%  $\text{H}_2\text{O}_2$  甲醇液室温处理 30min，蒸馏水洗 3 次，3min/次。
- 2) 每片滴加 50 $\mu\text{l}$  蛋白酶 K 溶液覆盖标本，37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 10min (可根据切片厚度及组织类型进行适当调整，细胞爬片和冰冻切片此步省略)。



- 3) 0.1M PBS 洗 3 次, 3min/次。
- 4) 每张切片上滴加 50 $\mu$ l 预杂交液于标本上, 37~42 $^{\circ}$ C 孵育 2~4h, 不洗, 甩去多余液体 (湿盒必须保湿)。
- 5) 储存浓度为 1 $\mu$ g/ul 的地高辛标记探针用 DEPC 水稀释至 20ng/ul 后在 95 $^{\circ}$ C 下变性 5min, 取出后立即冰浴, 再按探针: 杂交液为 1:9 比例混合为探针/杂交液工作液。
- 6) 每张切片加 1 滴探针/杂交工作液, 加盖玻片 \* 不要留有气泡。
- 7) 将切片放入湿盒中, 42 $^{\circ}$ C 杂交过夜 (杂交时间最长不能超过 24 小时) (湿盒必须保湿)。
- 8) 37 $^{\circ}$ C 水浴, 梯度 SSC 洗涤 (2 $\times$ SSC 洗涤 2 次, 5min/次; 0.5 $\times$ SSC 洗涤 2 次, 15min/次; 0.2 $\times$ SSC 洗涤 2 次, 15min/次)。
- 9) 每片滴加封闭液 50 $\mu$ l, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min, 甩去多余液体, 不洗。
- 10) 每片滴加 50 $\mu$ l 过氧化物酶标记链亲和素 (HRP-SP), 37 $^{\circ}$ C 孵育 60min, 0.1M PBS 洗 3 次, 3min/次
- 11) 显色 (避光): 每片滴加 50 $\mu$ l DAB 工作液 50 $\mu$ l, 通常显色 5~30min。显微镜下观察无背景出现可继续显色, 显色结束后, 水洗终止。
- 12) 苏木素复染 1~5min, 水洗终止。
- 13) 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 封片。

## 2、DNA 原位杂交

- 1) 在组织片上滴加 1 滴 DNA 探针/杂交工作液, 盖上一张盖玻片或 Parafilm 膜。
  - 2) 将上述切片放在烤箱中或加热箱中, 95 $^{\circ}$ C 条件下 8~10min 以使 DNA 变性。
- 以下步骤同 RNA 原位杂交 7) ~13)。

## 五、保存和有效期:

4 $^{\circ}$ C 保存, 1 年有效。