



Enhanced Sensitive ISH Detection KitI(POD)

敏感性加强型原位杂交检测试剂盒I（过氧化物酶）

产品货号： MK1030

保 存： 置 4°C。

工 作 量： 100 张切片。

有 效 期： 一年。

所谓原位杂交是指借助于核酸分子杂交的方法，在显微镜水平检测和定位特异的核苷酸片段。现在原位杂交已成为在分子水平研究肿瘤和遗传性疾病的发生，发展和调控等根本性问题的有力工具，其作用是免疫组化所无法代替的。博士德专门设计了敏感性加强型原位杂交检测试剂盒。具有敏感性特高，操作简便和结果准确的优点。该试剂盒分为两种，一种为过氧化物酶检测，一种为碱性磷酸酶检测系统。用于 mRNA 的杂交。MK1030 和 MK1032 仅适于地高辛高效标记的寡核苷酸探针，不推荐使用每个探针分子仅标记一个地高辛的寡核苷酸探针。如果使用 cDNA 探针，应在杂交之前变性探针。

试剂盒中内容：

- | | |
|---------------------|------|
| 1. 胃蛋白酶（×10；Pepsin） | 2ml; |
| 2. 预杂交液 | 2ml; |
| 3. 寡核苷酸探针杂交稀释液 | 2ml; |
| 4. 封闭液 | 5ml; |
| 5. 生物素化鼠抗地高辛 | 5ml; |
| 6. SABC--POD | 5ml; |
| 7. 生物素化过氧化物酶 | 5ml. |

用户自备试剂：

原位杂交专用盖玻片；POLY-L-LYSINE；DEPC；20%甘油；

缓冲液（3%柠檬酸，2×SSC(AR0058)，0.5×SSC，0.2×SSC，0.5M PBS(AR0033)）

一. 培养细胞和冰冻切片

准备工作：

3%柠檬酸——100ml 蒸馏水中加柠檬酸（C₆H₈O₇·H₂O）3g，pH2.0 左右。

2×SSC——1000ml 蒸馏水中加氯化钠 17.6g，柠檬酸三钠（C₆H₅O₇Na₃·2H₂O，分子量 294）8.8g。

0.5×SSC——300ml 蒸馏水加 100ml 2×SSC 即可。

0.2×SSC——270ml 蒸馏水加 30ml 2×SSC 即可。

20%甘油——20ml 甘油加 80ml 蒸馏水即可。

0.5M PBS——1000ml 蒸馏水加氯化钠 30g，Na₂HPO₄·12H₂O 6g，NaH₂PO₄·2H₂O 0.4g，pH7.2-7.6。

操作程序：

注意：最重要的是及时固定，并在固定液中加入 0.1%的 DEPC 处理，以抑制 RNA 酶对 mRNA 的分解作用。

1. 玻片的处理：一般采用多聚赖氨酸或 APES。切片厚度 10-20μm。

2. 细胞在多聚赖氨酸处理的盖玻片上进行培养，条件为 37°C 和 5%的 CO₂，所用培养基为 Dulbecco 基础培养基。细胞长好后 0.5M PBS(pH7.4)洗 2min×3 次。

3. 培养细胞和冰冻切片均可用下述方法固定：固定液为 4%多聚甲醛，

含有 1/1000 DEPC。室温固定 20-30min。蒸馏水充分洗涤，干燥后-20°C冰冻可保存 2 周以上。



4. 30% H_2O_2 一份+甲醇 50 份混合，室温处理 30min 以灭活内源性过氧化物酶。蒸馏水洗涤 3 次。
5. 暴露 mRNA 片段：切片上滴加 3%柠檬酸新鲜稀释的胃蛋白酶（1ml 3%柠檬酸加 2 滴浓缩型胃蛋白酶，混匀），37°C或室温消化 5-120 秒钟。有时也可以不消化。0.5M PBS 洗 3 次×5min。蒸馏水洗 1 次。
6. 预杂交：湿盒的准备——干的杂交盒底部加 20%甘油 20ml 以保持湿度。按每张切片 20 μ l 加预杂交液。恒温箱 37-40°C 2-4 小时。吸取多余液体，不洗。
7. 杂交——用杂交稀释液稀释地高辛标记的寡核苷酸探针，浓度一般 0.5-2 μ g/ml。按每张切片加 20 μ l 杂交液。将原位杂交专用盖玻片的保护膜揭掉后，盖在切片上。恒温箱 37-40°C 杂交过夜。
8. 杂交后洗涤：揭掉盖玻片，30-37°C左右水温的 2×SSC 洗涤 5min×2 次；0.5×SSC 洗涤 15min×1 次；0.2×SSC 洗涤 15min×1 次。必要时可重复 0.2×SSC 洗涤 1 次。
9. 滴加封闭液：37°C 30min。甩去多余液体，不洗。
10. 滴加生物素化鼠抗地高辛：37°C 60min 或室温 120min。0.5M PBS 洗 5min×4 次。勿用其它缓冲液和蒸馏水洗涤。
11. 滴加 SABC：37°C 20min 或室温 30min。0.5M PBS 洗 5min×3 次。勿用其它缓冲液和蒸馏水洗涤。
12. 滴加生物素化过氧化物酶：37°C 20min 或室温 30min。0.5M PBS 洗 5min×4 次。
13. DAB 显色：使用 DAB 显色试剂盒—1ml 蒸馏水加显色剂 A, B, C 各一滴，混匀，加至标本上。镜下控制显色，一般在 30min 内。若无背景出现则可继续显色。也可自配 DAB 显色剂后显色。充分水洗。
14. 必要时苏木素复染，充分水洗。
15. 酒精脱水，二甲苯透明，封片。

二. 石蜡切片

如果有条件的话，应尽可能地采用新鲜标本。标本离体后，及时予以固定。固定液为 4%多聚甲醛，含有 1/1000 DEPC。标本较大时用刀片切成厚度不超过 4mm 的小块，固定 1 小时即可，较大的标本固定不要超过 2 小时。某些组织对过度固定尤其敏感，如动物大脑，固定时间 30-40min，一般不要超过 1 小时。

1. 常规脱水、浸蜡、包埋。切片厚度 6-8 μ m。
2. 玻片的处理：一般采用多聚赖氨酸或 APES。
3. 石蜡切片经常规脱蜡至水。3% H_2O_2 室温处理 10 分钟以灭活内源性过氧化物酶。蒸馏水洗涤 2 次。
4. 暴露 mRNA 片段：切片上滴加 3%柠檬酸新鲜稀释的胃蛋白酶（1ml 3%柠檬酸加 2 滴浓缩型胃蛋白酶，混匀），37°C或室温消化 3-30min（视标本新旧、厚薄自行调整）。充分的消化可以使 mRNA 得到暴露，从而增强杂交信号；但另一方面，过度的消化又使切片明显减薄乃至消失，从而失去杂交信号。由于用户的切片情况各不相同，这就需要用户比较不同的消化时间，例如 5min, 10min, 20min, 30min。以找到最佳的消化时间。0.5M PBS 洗 3 次×5min。蒸馏水洗 1 次。

其余步骤和冰冻切片 6-15 步相同。

结果观察：阳性细胞的胞浆着色呈棕黄色。

注意事项：如果有少量的细胞核着色属于正常情况；如果出现大量的细胞核着色，往往和标本固定时间过长有关，应重新处理标本。有其它明显的非特异性染色现象时，可以用预杂交液对含探针的杂交液进行稀释，一般稀释 2-5 倍。