



ISH Detection Kit III(AP)

通用型原位杂交检测试剂盒III (碱性磷酸酶)

产品编号: MK1031

工作 量: 100张切片左右 (组织大小不同, 实际工作量会有差异)

组分名称	规格	用途/用法	保存条件
胃蛋白酶(×10)	1ml	用蛋白酶稀释液按照1:10比例稀释	4℃保存 一年, 避免 冷冻
蛋白酶稀释液	12ml	为3%柠檬酸。用于稀释胃蛋白酶	
预杂交液	2ml	探针杂交前的预杂交。即用型, 直接滴加	
探针稀释液	2ml	用于稀释探针	
封闭液	5ml	抗体孵育前的封闭。即用型, 直接滴加	
鼠抗地高辛抗体 (AP, 200X)	5ml	碱性磷酸酶标记的小鼠抗地高辛抗体。浓缩液, 需用0.01M TBS稀释200倍	
显色剂A(×20)	0.5ml	BCIP/NBT 显色剂A, 需稀释20倍	
显色剂B(×20)	0.5ml	BCIP/NBT 显色剂B, 需稀释20倍	
中性核固红	6ml	复染, 即用型, 直接滴加	
水溶性封片剂	6ml	封片剂, 即用型, 直接滴加封片	

实验介绍:

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。MK1031 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。



实验客户需自备:

- ① 4%多聚甲醛 (含DEPC) (AR1069)
- ② 2×SSC(AR0058)
- ③ 0.5M PBS(AR0033)
- ④ 0.01M TBS(AR0031)
- ⑤ Triton X- 100 (用于细胞片)

原杂实验常用试剂的配制方法:

- ① 3%柠檬酸—— 100ml 蒸馏水中加柠檬酸($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) 3g, pH2.0 左右。
- ② 2×SSC—— 1000ml 蒸馏水中加氯化钠 17.6g, 柠檬酸三钠($C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$, 分子量 294) 8.8g。
- ③ 0.5×SSC——300ml 蒸馏水加 100ml 2×SSC 即可。
- ④ 0.2×SSC——270ml 蒸馏水加 30ml 2×SSC 即可。
- ⑤ 0.5M PBS—— 1000ml 蒸馏水加氯化钠 30g, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 6g, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 0.4g, pH7.2-7.6。
- ⑥ 0.01M TBS—— 1L 双蒸馏水中加入 8.5 克氯化钠,1.2 克 Tris, pH7.2--7.6。

A. 石蜡片及冰冻片染色步骤:

1. 石蜡切片, 常规脱蜡至水。冰冻片无需此操作, 从第2步开始。
2. 暴露 mRNA 片段: 滴加新鲜配制的胃蛋白酶(胃蛋白酶: 蛋白酶稀释液=1:10, 现配现用), 室温孵育消化 2-10 分钟(新鲜样本可以考虑不消化, 越陈旧的样本消化时间越长)。0.5M PBS 洗 3 次×5分钟。蒸馏水洗 1 次。
3. 预杂交: 按每张切片 20 μ l 加预杂交液。37 $^{\circ}$ C 孵育2-4 小时。吸取多余液体, 不洗。孵育期间一定要保证组织为湿润状态, 不得干片(湿盒内加足量的水)
4. 杂交。用探针稀释液稀释地高辛标记的寡核苷酸探针(稀释后的杂交液浓度一般为 0.5-2 μ g/ml)。每张切片加 20 μ l 稀释好的杂交液(需保证覆盖组织, 若组织过大, 可适量增加杂交液的量), 40 $^{\circ}$ C 杂交过夜(若此温度阳性结果不明显, 可提高杂交温度至60 $^{\circ}$ C, 期间需保证组织不得干片)。
5. 杂交后洗涤: 2×SSC 洗涤 5分钟×2 次; 0.5×SSC 洗涤 15分钟×1 次; 0.2×SSC 洗涤 15分钟×1 次。必要时可重复 0.2×SSC 洗涤 1 次。
6. 封闭: 滴加封闭液, 37 $^{\circ}$ C 孵育30min。甩去多余液体, 不洗。
7. 滴加碱性磷酸酶标记小鼠抗地高辛: 用 0.01M TBS 按 1: 200 稀释, 37 $^{\circ}$ C孵育 60分钟, 或室温 2 小时, 0.01M TBS 洗 5- 10分钟×4 次。勿用其它缓冲液和蒸馏水洗涤。
8. 显色: BCIP/NBT 显色液A: 显色液B: 蒸馏水按照1: 1: 20 比例配制(1ml显色液配置方法: 1ml蒸馏水+50 μ l 显色液A+50 μ l 显色液B), 现配现用, 混匀后加至切片。镜下控制反应时间(该显色液显色时间较长, 若无背景出现可长时间显色, 直至结果满意为止)。蒸馏水洗涤。
9. 核固红轻度复染。水洗, 干燥后水溶性封片剂封片(AR1018)。
10. 显微镜观察。



B. 细胞片的染色步骤:

1. 取出细胞爬片, TBS缓冲液浸泡5min。
2. 破膜。使用0.25% Triton X- 100 处理细胞 15min, TBS 缓冲液洗涤, 5min×3 次。
其余步骤和石蜡切片 2-10 步相同。

结果观察: 阳性着色为蓝紫色, 但要注意区分非特异着色。

注意事项:

1. 原位杂交实验的样本固定很重要。首先是固定液中需加入0.1%的DEPC, 以抑制RNA酶对核酸的分解作用。其次, 固定时间建议不要超过6小时(细胞片15分钟即可), 过度固定会造成背景加深、阳性减弱、定位不准等不利影响。
2. 实验中预杂交和杂交温度较高, 需在湿盒中加足量的水以保证样本始终处于湿润状态, 切勿干片。
3. 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。
4. 当其它非特异性染色很明显时, 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。