天净沙系列

CAT#:930906

低温运输，-20℃保存

高效核酸杂交液（原位杂交专用）

High-Efficiency Nucleic Acid Hybridization Buffer for In Situ Hybridization

使用手册 V1.01

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

原位杂交（in situ hybridization，ISH）是在一定生物结构基础之上的核酸杂交。这种结构基础可以是一条染色体；一个细菌；更大结构基础是细胞和组织。基本原理是两条核苷酸单链片段，在适宜的条件下，通过氢键结合，形成DNA-DNA、DNA-RNA或 RNA-RNA 双键分子，应用带有标记的（有放射性同位素，如3H、35S、32P、荧光素生物素、地高辛等非放射性物质）DNA或RNA片段作为核酸探针，与组织切片或细胞内待测核酸（RNA或DNA）片段进行杂交，然后可用放射自显影等方法予以显示，在光镜或电镜下观察目的 mRNA或DNA 的存在并定位。本产品就是用于原位杂交的杂交液。它有下列特点：

1. 即开即用，不用用户自己购买原料配制和优化配方。
2. 有很高的敏感性和特异性（跟探针设计，杂交温度等密切相关）。
3. 既可以用于RNA原位杂交、DNA原位杂交，也可以用于荧光原位杂交（FISH）。
4. 如果使用Oligo探针进行原位杂交，则需要购买另外Oligo探针杂交液系列产品。
5. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品使用 logo 热封袋包装

成分	编号	规格	包装
高效核酸杂交液（原位杂交专用）	930906	10 mL	10 mL 本色瓶
使用手册	930906sc	1 份	无

运输及保存

低温运输和-20℃保存、有效期一年。

自备物品

盖玻片、多聚甲醛等。

使用流程

以检测 mRNA 序列的切片原位杂交为例。

一、培养细胞和冰冻切片的原位杂交

1. 玻片的处理：一般采用多聚赖氨酸或APES处理拨片。切片厚度10-20 μm。
2. 细胞在多聚赖氨酸处理的盖玻片上进行培养，条件为37℃和5%的CO2，所用培养基为Dulbecco基础培养基。细胞长好后0.1M PBS(PH 7.4)洗2分钟×3次。
3. 培养细胞和冰冻切片均可用下述方法固定：用4%多聚甲醛固定液（in 0.1 M RNase-free PBS，pH 7.2-7.6）室温固定30分钟，用蒸馏水充分洗涤，干燥后-20℃冰冻可保存2周以上。
4. 将30% H2O2和纯甲醇按1：50的比例混合，然后用此混合液室温处理细胞30分钟以灭活内源性酶。蒸馏水洗涤3次。
5. 暴露mRNA核酸片段：在切片上滴加3%柠檬酸新鲜稀释的胃蛋白酶（1 mL 3%

柠檬酸加2滴浓缩型胃蛋白酶，混匀），37℃或室温消化5-120秒钟

6. 用PBS洗3次×5分钟，蒸馏水洗1次。
7. 用4%多聚甲醛固定液（in 0.1 M RNase-free PBS，pH 7.2-7.6）再室温固定10分钟，然后蒸馏水洗涤3次。如果使用胃蛋白酶消化才需要再固定这一步。
8. 预杂交：在杂交盒底部加20%甘油20 mL以保持湿度。按每张切片加20 μL预杂交液。恒温箱38-42℃放置2-4小时。吸弃多余杂交液，不用洗切片。
9. 靶分子的变性。靶分子为mRNA，故可以跳过此步。如果为DNA的则必须变性。将探针溶液加到切片上，盖上盖玻片，80℃烘箱变放置10 min，冷却至37℃后进入下一步。
10. 杂交：每张切片加20 μL核酸杂交液（原位杂交专用），盖上原位杂交专用盖玻片，放恒温箱38-42℃杂交过夜(根据杂交情况可以调节)。
11. 杂交后洗涤：揭掉盖玻片，用37℃预热的2×SSC洗涤5分钟×2次；37℃ 0.5×SSC洗涤15分钟×1次; 37℃ 0.2×SSC洗涤15分钟×1次(如果有非特异性染色，重复0.2×SSC洗涤15分钟×1-2次)。
12. 滴加封闭液，37℃放置30分钟。甩去多余封闭液，不洗。
13. 根据探针标记物，选择相应显色方法显色、复染，脱水、封片。
14. 结果观察。

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。固定液选择 4%多聚甲醛（in 0.1 M PBS，pH 7.0-7.6）。标本较大时用刀片切成厚度不超过 4 mm 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 30-40 分钟，一般不要超过 1 小时。

15. 常规脱水、浸蜡、包埋、切片。切片厚度在6-8 μm。
16. 玻片的处理：一般采用多聚赖氨酸或APES预先处理。
17. 石蜡切片经常规脱蜡至水。将30%H2O2 和蒸馏水的1：10混合液加到切片上，室温放置10分钟以灭活内源性酶。蒸馏水洗3次。
18. 暴露mRNA核酸片段：在切片上滴加3%柠檬酸新鲜稀释的胃蛋白酶（1 mL 3%柠檬酸加2滴浓缩型胃蛋白酶，混匀），37℃或室温消化3-30分钟（视标本新旧、厚薄自行调整）。用户可以比较不同的消化时间，例如5分钟,10 分钟，20分钟，30分钟。以找到最佳的消化时间。原位杂交用PBS洗3次×5分钟。蒸馏水洗1次。
19. 其余步骤同冰冻切片（第1节第6-11步相同）。

关联产品	核酸杂交液（Oligo 探针）