天净沙系列

CAT#:930906-3

低温运输，-20℃保存

天净沙

超快 DNA 探针-RNA 模板原位杂交试剂盒

Ultra-Fast DNA Probe - RNA Template In Situ Hybridization Kit

使用手册 V0.51

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。本产品就是用于超快DNA探针-RNA模板原位杂交的试剂盒。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. 可以用于DNA探针-RNA原位杂交。
4. 可用于30张切片的原位杂交
5. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品用十一孔盒包装

成分	编号	规格	包装材料
20 mg/mL 胃蛋白酶溶液 (ISH 专用)	8-251210	320 μL	0.5 mL 红盖管
胃蛋白酶稀释液	930906-3a	2 mL × 2	2 mL 绿盖管
高效核酸杂交液 (原位杂交专用)	930906	1 mL	2 mL 本色管
ISH 专用封闭液	930906-3b	2 mL	2 mL 黄盖管
0.25% Triton X-100	C9002-93-1	2 mL × 2	2 mL 蓝盖管
使用手册	930906-3sc	1 份	无

运输及保存

低温运输和-20℃保存、有效期一年。

自备试剂

DNA探针、DEPC、4%多聚甲醛、0.5 M PBS、2× SSC、TBS缓冲液等。

使用方法

一、石蜡片及冰冻片的原位杂交

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）。0.5 M PBS洗3次，每次5分钟。蒸馏水洗1次。

	3. 预杂交：按每张切片20 μL加高效核酸杂交液（原位杂交专用）。37℃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。用自选方法稀释DNA探针（稀释后的杂交液浓度一般为0.5-2 μg/mL）。每张切片加20 μL稀释好的探针杂交液（需保证覆盖组织，若组织过大，可适量增加杂交液的量），40℃杂交过夜（若此温度阳性结果不明显，可提高杂交温度至60℃，期间需保证组织不得干片）。 5. 杂交后洗涤：2× SSC洗涤5分钟，进行2次；0.5× SSC洗涤15分钟进行1次；0.2× SSC洗涤15分钟进行1次。必要时可重复0.2× SSC洗涤1次。 6. 封闭：滴加ISH专用封闭液，37℃ 孵育30 min。甩去多余液体，不洗。 7. 根据探针标记物，选择相应显色方法显色、复染，脱水、封片。 8. 结果观察。 **二、细胞片的染色步骤** 9. 取出细胞爬片，TBS缓冲液浸泡5 min。 10. 破膜。使用0.25% Triton X-100处理细胞15 min，TBS缓冲液洗涤5 min进行3次。 11. 其余步骤和石蜡切片2-8步相同。 **三、注意事项** 12. 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。 13. 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。 14. .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。 15. 当其它非特异性染色很明显时，可以用高效核酸杂交液（原位杂交专用）对含探针的杂交液进行稀释，一般稀释2-5倍。
关联产品	核酸杂交液（Oligo 探针）