天净沙系列

CAT#:250802

常温运输和保存

原位邻位连接试剂盒（滚环扩增法）

In situ Proximity Ligation Assay Kit (RCA)

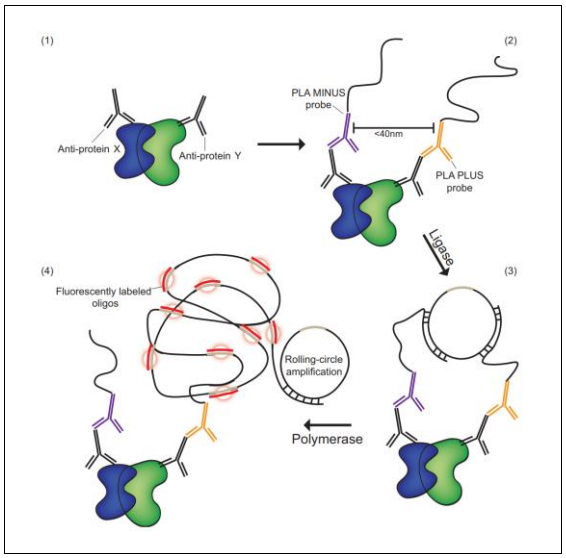
使用手册 V0.5

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

本产品是基于邻近连接和滚环扩增的原位蛋白质 A-蛋白质 B 相互作用检测试剂盒，其原理示意图如下：



本产品具有下列特点：

1. 一站式，含有邻位连接和 RCA 扩增试剂盒，不需要单独准备各成份。
2. 操作流程经过天净沙进行优化，用户不需要花费时间优化。
3. 起始材料为新鲜制备的细胞切片，不能用于悬浮细胞。
4. 能原位可视化显示亚细胞水平的蛋白质 A-蛋白质 B 的相互作用或修饰前-修饰后蛋白的位置关系，检测的邻近距离范围为 40 nm 左右，分辨率可达到单分子水平。
5. 荧光染料为 FITC，如果需要其他荧光，需定制。
6. 既能检测到稳定的，也能检测到短暂的蛋白质 A-蛋白质 B 互作，不需要重组表达一个或两个互作蛋白质。
7. 本试剂盒提供的两个 OAC（Oligo-抗体偶联物）分别识别小鼠和兔子的一抗，故用户自备的一抗必须是源于小鼠和兔子的，否则无法使用本试剂盒。
8. 本产品可以进行 30 次邻位连接和 RCA 扩增，不包括切片制备试剂。
9. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品使用大扁盒包装

名称	编号	规格	包装
OAC A	250802a1	30 μL	0.5 mL 白盖管
OAC B	250802a2	30 μL	0.5 mL 蓝盖管
2×PLA DNA 连接液	250802b1	300 μL	0.5 mL 绿盖管
PLA 桥连 DNA（干粉）	250802b2	30 T	30 mL 黄盖管
PLA DNA 连接酶	250802b3	30 μL	0.5 mL 红盖管

	PLA-RCA MasterMix	250802c1	30 T	0.5 mL 本色管
	PLA-RCA DNA 聚合酶	250802c2	20 μL	0.5 mL 红盖管
	PLA-RCA 扩增产物探针（干粉）	250802d1	30 T	1.5 mL 棕色管
	PLA 复染液	250802d2	300 μL	1.5 mL 棕色管
	使用手册	250802sc	1 份	1 份

运输及保存

低温运输，-20℃保存，有效期一年。

自备试剂

分别来于小鼠和兔的识别两个互作蛋白的一抗，抗体稀释液，细胞固定和穿透相关试剂

使用方法

一：预实验优化条件

1. 用户必须先用常规免疫荧光方法，检测所用识别两个互作蛋白质的抗体对能够进行常规的荧光检测。一个抗体必须来源于大鼠，另一个抗体必须来源于小鼠。只有在常规免疫荧光检测成功后，才能进入下一步操作。

二、切片制备（本试剂盒不含相关试剂，下面操作和 s 只是示例）。

2. 细胞固定： 4% PFA in PBS 常温固定 15 分钟，PBS 洗涤 3 次。
3. 细胞渗透：0.5% Tritin X-100 和 1% BSA（in PBS）37℃渗透 30 分钟。
4. 洗涤：PBS 洗涤 3 次，最后用 5 μL PBS 覆盖切片防止干燥。

三、邻位连接

5. 首次使用本产品时，或在后续实验遇到问题需要分析原因时，用户可以根据最可能出问题的环节，选择设置下列 7 个对照中的一个或几个：无一抗对照（包括不加两个对照中的一个或两个一抗抗体均不加），不加 PLA DNA 连接酶对照，不加 DNA 聚合酶对照，不加桥连 DNA 对照，不加 PLA-RCA 扩增产物探针对照。
6. 在切片上加入两种 OAC A 和 OAC B 各 5 μL，室温放置 1 小时。注意：AOC 的浓度非常关键，而它又跟靶蛋白的丰度有关，而丰度往往未知，故需预实验确定。
7. 洗涤：用 TBS-T 洗涤 4 次，每次 15 分钟。最后用 5 μL PBS 覆盖切片防止干燥。
8. 配制 PLA 连接工作液：在一干净的 1.5 mL 塑料离心管中按下表新鲜配制，用多少配制多少。首次配制时需要在 PLA 桥连 DNA(干粉)管中加入 300 μL 2×PLA DNA 连接液，涡旋 30 秒混匀，短暂离心得 2×PLA DNA 连接液（含桥连 DNA），放冰上待用。没用完的此溶液需要放-20℃保存。

成份	1 个样本的用量	N 个样本的用量
2×PLA DNA 连接液（含桥连 DNA）	9 μL	9 μL×（N+1）
PLA DNA 连接酶	1 μL	1 μL×（N+1）

合计	10 μL	10 μL× (N+1)

9. 将 PLA 连接工作液立即加到切片上，每张切片加入 10 μL，30℃保温 45 分钟。

10. 洗涤：用 TBS-T 洗涤 3 次，每次 1 分钟。最后用 5 μL PBS 覆盖切片防止干燥。

四、RCA 扩增

11. 配制 RCA 扩增工作液：在一干净的 1.5 mL 塑料离心管中按下表新鲜配制，用多少配制多少。首次配制时需要在 PLA 桥连 DNA（干粉）管中加入 60 μL 超纯水，涡旋 30 秒混匀，短暂离心得 PLA 桥连 DNA 溶液，放冰上待用。没用完的 PLA 桥连 DNA 溶液需要放-20℃保存。

成份	1 个样本的用量	N 个样本的用量
PLA-RCA 反应液	9 μL	9 μL× (N+1)
PLA-RCA DNA 聚合酶	1 μL	1 μL× (N+1)
合计	10 μL	10 μL× (N+1)

12. 将上步所得 RCA 工作液加到切片上，每张切片加入 10 μL，32℃保温 2 小时。

13. 洗涤：用 TBS-T 洗涤 2 次，每次 1 分钟。最后用 5 μL PBS 覆盖切片防止干燥。

五、荧光检测

14. 配制 PLA 荧光检测工作液：在一干净的 1.5 mL 塑料离心管中按下表新鲜配制，用多少配制多少。首次配制时需要在 PLA 荧光检测试剂 A(干粉)管中加入 300 μL PLA 复染液，涡旋振荡 30 秒混匀，得 PLA 荧光检测液，放冰上待用。没用完的 PLA 荧光检测液需要放-20℃保存。

15. 将 PLA 荧光检测液加到切片上，每张切片加入 10 μL，32℃保温 30 分钟。

16. 洗涤：用 TBS-T 洗涤 3 次，每次 1 分钟。

17. 荧光显微镜下检测。 在 490 nm 激发波长-520 nm 发射波长下检测到的信号代表 RCA 扩增产物（表示蛋白互作位点）。在 360 nm 激发波长-460 nm 发射波长下检测到的结构为细胞核，依此可准确判断蛋白互作或翻译后修饰发生在核内还是核周。在 500 nm 激发波长-520 nm 发射波长下检测到的结构是细胞质 F-actin 网络，依此作为细胞内部的地图，可精确判断 PLA 信号点是位于细胞膜附近、细胞质中，还是富集在某种特定的骨架结构周围。

关联产品	滚环扩增试剂盒