

天
净
沙
系
列

CAT#:130906-10
低温运输, -20℃保存。

TIANDZ

超级杂交液（原位杂交）

SuperHyb Solution for ISH

使用手册 V1.0

北京天恩泽基因科技有限公司

北京市海淀区上地信息路 26 号北京市留学人员海淀创业园中关村创业大厦 506 网

址: www.tiandz.com; 电话: 010-62200278; 电邮: order@tiandz.com

产品及特点	原位杂交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；用原位杂交技术，可在原位研究细胞合成某种多肽或蛋白质的基因表达。此方法有很高的敏感性和特异性，可进一步从分子水平来探讨细胞的功能表达及其调节机制。已成为当今细胞生物学、分子生物学研究的重要手段。 本产品为天恩泽公司开发的即用型原位杂交专用核酸杂交液。既可以用于RNA原位杂交、DNA原位杂交，也可以用于FISH原位杂交等试验。				
规格及成分		成分 本产品 使用手册	编号 130906 130906sc	10 mL 包装 10 mL 1 份	
运输及保存	低温运输和-20℃保存、有效期一年。				
自备试剂	盖玻片、多聚甲醛等				
使用方法	以检测 mRNA 序列为例。 培养细胞和冰冻切片 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℃和 5%的 CO₂，所用培养基为 Dulbecco 基础培养基。细胞长好后 0.1M PBS(pH7.4)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：固定液为 4%多聚甲醛/0.1 M PBS （pH7.2-7.6），含有 1/1000 DEPC。室温固定 20--30 分钟。蒸馏水充分洗涤，干燥后-20℃冰冻可保存 2 周以上。 4. 30%H₂O₂ 1 份+纯甲醇 50 份混合，室温30 分钟。蒸馏水洗涤 3 次。 5. 暴露 mRNA 核酸片段：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℃或室温消化 5-120 秒钟。有时也可以不消化。原位杂交用 PBS 洗 3 次×5 分钟。蒸馏水洗 1 次。				

6. 后固定：胃蛋白酶消化后才需要。固定液为 1%多聚甲醛/0.1 M PBS (pH7.2-7.6)，含有 1/1000 DEPC。室温固定 10 分钟。蒸馏水洗涤 3 次。
7. 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。
按每张切片加 20 μ L 预杂交液（提前加入鲑鱼精 DNA，终浓度为 100 μ g/mL）。恒温箱 38-42 $^{\circ}$ C 2-4 小时。吸取多余液体，不洗。
注：靶 DNA 的变性
DNA-DNA 杂交检测中，在杂交前需要增加靶 DNA 的变性步骤（对 mRNA 的原位杂交无需此步）。样品 DNA 的变性可能会造成样品形态学的部分破坏，此步是实验中需要优化的一个步骤。实验时可以摸索变性时间、变性温度等参数以获得最佳条件。可以将探针的变性和样品 DNA 变性同步进行：将样品和探针溶液加盖盖玻片，置于烘箱 80 $^{\circ}$ C 变性，处理 5-10 分钟，后冷却至 37 $^{\circ}$ C 进行杂交。
8. 杂交——按每张切片 20 μ L 杂交液（探针终浓度约为 1ng/ μ L；杂交液提前加入鲑鱼精 DNA，终浓度为 100 μ g/mL），加在切片上。将原位杂交专用盖玻片的保护膜揭开后，盖在切片上。恒温箱 38-42 $^{\circ}$ C 杂交过夜(根据杂交情况可以调节)。
9. 杂交后洗涤：揭掉盖玻片，37 $^{\circ}$ C 左右水温的 2 $\times$ SSC 洗涤 5 分钟 $\times$ 2 次；37 $^{\circ}$ C 0.5 $\times$ SSC 洗涤 15 分钟 $\times$ 1 次；37 $^{\circ}$ C 0.2 $\times$ SSC 洗涤 15 分钟 $\times$ 1 次(如果有非特异性染色，重复 0.2 $\times$ SSC 洗涤 15 分钟 $\times$ 1-2 次)。
10. 滴加封闭液：37 $^{\circ}$ C 30 分钟。甩去多余液体，不洗。
11. 根据探针标记物，选择相应显色方法显色、复染，脱水、封片。
12. 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。固定液为 4%多聚甲醛/0.1 M PBS (pH7.0-7.6)，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 30-40 分钟，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。30%H_2O_2 1 份+蒸馏水 10 份混合,室温 5-10 分钟以灭活内源性酶。蒸馏水洗 3 次。 4. 暴露 mRNA 核酸片段: 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℃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。 5. 其余步骤和冰冻切片 6-11 步相同。 6. 结果观察。
关联产品	超级杂交液 (Oligo 探针) (CAT: 130904) 超级杂交液 (芯片) (CAT: 130905)