

原位杂交操作规程

(检测石蜡包埋组织 mRNA)

注意事项:

- 1.杂交前和杂交过程中所用物品设备应防止 RNase 污染
- 2.相关试剂均需用 DEPC 处理过的双蒸水配制(双蒸水中加入 0.1%DEPC,摇动放置 3-4 小时,高压消毒灭活 DEPC 后备用)
- 3.试剂配制应防止 RNase 污染

相关试剂配置

1. DEPC-PBS(DEPC 处理的磷酸盐缓冲液): 140mMNaCl;2.7mM KCL;10mM Na₂HPO₄;1.8mM KH₂PO₄ pH7.4 (用 DEPC 处理的双蒸水配置)
2. TE 缓冲液:10mM Tris, 1mM EDTA,pH8.0
3. 0.1M 三乙醇胺(pH8.0): 三乙醇胺 5.33ml DEPC 处理的双蒸水定容至 1L
4. 20×SSC 175.3g ; 柠檬酸三钠 88.2g DEPC 处理的双蒸水定容 1L
5. 100×Denhardt's: Ficoll400 2g; PVP (聚乙烯吡咯烷酮)2g ; BSA(小牛血清白蛋白)2g ; DEPC 处理的双蒸水定容至 100ml
6. 寡核苷酸探针杂交缓冲液: 配制 20ml(20×SSC 4ml ; 硫酸葡聚糖 4g; 去离子甲酰胺 10ml; PolyA(10mg/ml) 0.5ml ; 鱼精 ssDNA(10mg/ml) 0.5ml; tRNA(10mg/ml) 0.5ml;1M 二硫代苏糖醇(DTT) 2ml;50×Denhardt's 0.2ml(-20℃保存, 使用前平衡到 37℃
7. 缓冲液 A: 100mMTris-HCL(pH7.5); 150mMNaCL

8. 封闭液: 缓冲液 A 中加入 0.1% Triton-X100 和 2% 正常山羊血清
9. 缓冲液 B: 100mM Tris-HCL(pH9.5); 100mM NaCl; 50mM MgCl₂
10. 缓冲液 C: 10mM Tris-HCL(pH8.1); 1mM EDTA

程序

1. 二甲苯脱蜡, 梯度酒精水化, DEPC 处理的 ddH₂O 速洗两次, DEPC-PBS(用 DEPC 处理过的双蒸水配制的磷酸盐缓冲液)洗 2 × 5 分钟
2. DEPC-PBS 稀释的 0.3% Triton-X100 处理 15 分钟
3. DEPC-PBS 洗 2 × 5 分钟
4. TE 缓冲液稀释的 Rnase-free 蛋白酶 K(蛋白酶 K 用于石蜡切片的建议浓度为 5-20 μg/ml)在 37°C 孵育 10-30 分钟或者 0.2M HCL 稀释的 0.1% 胃蛋白酶(胃蛋白酶用于石蜡切片的建议浓度为 100-500 μg/ml)在 37°C 孵育 20-30 分钟(具体孵育时间需自行摸索)
5. 如果用蛋白酶处理, 处理后 PBS+2mg/ml 甘氨酸洗 30 秒至 1 分钟, 然后 DEPC-PBS 洗 2 × 5 分钟; 如果用胃蛋白酶处理, 处理后 DEPC-PBS 洗 2 × 5 分钟
6. DEPC-PBS 稀释的 4% 多聚甲醛后固定 10-15 分钟
7. DEPC-PBS 洗 2 × 5 分钟
8. 0.1M 三乙醇胺稀释的 0.25% 醋酸酐孵育 10 分钟(0.1M 三乙醇胺稀

释的 0.25%醋酸酐需在孵育前配置并立即使用且不能二次使用)

9. 2×SSC 洗 3 分钟
10. 不含探针的寡核甘酸探针杂交缓冲液在 37℃孵育 2 小时
11. 2×SSC 洗 5 分钟
12. 含探针杂交缓冲液在 37℃孵育约 18 小时
13. 1×SSC 在室温下速洗, 1×SSC 在 55℃水浴摇洗 2×15 分钟, 0.5×SSC 在 55℃水浴摇洗 2×15 分钟, 0.5×SSC 在室温下洗 10 分钟
- 14.缓冲液 A 摇洗 2×10 分钟
- 15.室温下封闭液孵育 30 分钟
- 16.除去封闭液在室温下用碱性磷酸酶标记的抗地高辛抗体孵育 2-4 小时(抗体用封闭液稀释)
- 17.缓冲液 A 洗 2×10 分钟
- 18.缓冲液 B 室温孵育 10 分钟
- 19.BCIP/NBT 避光显色 2-24 小时(由于石蜡组织在固定处理制作过程中难免有 RNA 的降解,我们建议用碱性磷酸酶-BCIP/NBT 显色系统,因为其敏感性较辣根过氧化物酶-DAB 显色系统更高)
- 20.缓冲液 C 终止显色,然后浸入蒸馏水
- 21.核固红套染(可染或不染),水溶性封片剂(water-soluble mounting media)封片,显微镜观察结果.



上海闪晶分子生物科技有限公司

地址: 上海市闵行区北桥镇吴河路328号A栋2楼

邮编: 201109

联系: 市场部

电话: 54460832 800-988-1995

E-mail: master@shinegene.org.cn

网址: www.shinegene.org.cn