

Enhanced Sensitive ISH Detection KitI(POD)

敏感性加强型原位杂交检测试剂盒I（过氧化物酶）

产品货号： MK1030

保 存： 置 4℃。

工 作 量： 100 张切片。

有 效 期： 一年。

所谓原位杂交是指借助于核酸分子杂交的方法，在显微镜水平检测和定位特异的核苷酸片段。现在原位杂交已成为在分子水平研究肿瘤和遗传性疾病的发生，发展和调控等根本性问题的有力工具，其作用是免疫组化所无法代替的。博士德专门设计了敏感性加强型原位杂交检测试剂盒。具有敏感性特高，操作简便和结果准确的优点。该试剂盒分为两种，一种为过氧化物酶检测，一种为碱性磷酸酶检测系统。用于 mRNA 的杂交。MK1030 和 MK1032 仅适于地高辛高效标记的寡核苷酸探针，不推荐使用每个探针分子仅标记一个地高辛的寡核苷酸探针。如果使用 cDNA 探针，应在杂交之前变性探针。

试剂盒中内容：

组分名称	规格	用途/用法	保存条件
胃蛋白酶（×10；Pepsin）	2ml	用蛋白酶稀释液按照 1:10 比例稀释	4℃保存 一年，避 免冷冻
蛋白酶稀释液	12ml	为 3%柠檬酸。用于稀释胃蛋白酶	
预杂交液	2ml	探针杂交前的预杂交。即用型，直接滴加	
寡核苷酸探针杂交稀释液	2ml	用于稀释探针	
封闭液	5ml	抗体孵育前的封闭。即用型，直接滴加	
生物素化鼠抗地高辛	5ml	生物素化鼠抗地高辛，即用型，直接滴加	
SABC-POD	5ml	过氧化物酶标记的 SABC 复合物。即用型，直接滴加	
生物素化过氧化物酶	5ml	生物素化过氧化物酶（B-POD），加强信号；即用型，直接滴加	

用户自备试剂：

原位杂交专用盖玻片；POLY-L-LYSINE；DEPC；20%甘油；

缓冲液（3%柠檬酸，2×SSC(AR0058)，0.5×SSC，0.2×SSC，0.5M PBS(AR0033)）

一．培养细胞和冰冻切片

准备工作：

3%柠檬酸——100ml 蒸馏水中加柠檬酸（C₆H₈O₇·H₂O）3g，pH2.0 左右。

2×SSC——1000ml 蒸馏水中加氯化钠 17.6g，柠檬酸三钠（C₆H₅O₇Na₃·2H₂O，分子量 294）8.8g。

0.5×SSC——300ml 蒸馏水加 100ml 2×SSC 即可。

0.2×SSC——270ml 蒸馏水加 30ml 2×SSC 即可。

20%甘油——20ml 甘油加 80ml 蒸馏水即可。



0.5M PBS——1000ml 蒸馏水加氯化钠 30g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 6g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.4g, pH7.2-7.6。

操作程序:

注意: 最重要的是及时固定, 并在固定液中加入 0.1% 的 DEPC 处理, 以抑制 RNA 酶对 mRNA 的分解作用。

1. 玻片的处理: 一般采用多聚赖氨酸或 APES。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°C 和 5% 的 CO_2 , 所用培养基为 Dulbecco 基础培养基。细胞长好后 0.5M PBS(pH7.4)洗 2min \times 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, 含有 1/1000 DEPC。室温固定 20-30min。蒸馏水充分洗涤, 干燥后 -20°C 冰冻可保存 2 周以上。
4. 30% H_2O_2 一份+甲醇 50 份混合, 室温处理 30min 以灭活内源性过氧化物酶。蒸馏水洗涤 3 次。
5. 暴露 mRNA 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°C 或室温消化 5-120 秒钟。有时也可以不消化。0.5M PBS 洗 3 次 \times 5min。蒸馏水洗 1 次。
6. 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 20 μl 加预杂交液。恒温箱 37-40°C 2-4 小时。吸取多余液体, 不洗。
7. 杂交——用杂交稀释液稀释地高辛标记的寡核苷酸探针, 浓度一般 0.5-2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。按每张切片加 20 μl 杂交液。将原位杂交专用盖玻片的保护膜揭掉后, 盖在切片上。恒温箱 37-40°C 杂交过夜。
8. 杂交后洗涤: 揭掉盖玻片, 30-37°C 左右水温的 2 \times SSC 洗涤 5min \times 2 次; 0.5 \times SSC 洗涤 15min \times 1 次; 0.2 \times SSC 洗涤 15min \times 1 次。必要时可重复 0.2 \times SSC 洗涤 1 次。
9. 滴加封闭液: 37°C 30min。甩去多余液体, 不洗。
10. 滴加生物素化鼠抗地高辛: 37°C 60min 或室温 120min。0.5M PBS 洗 5min \times 4 次。勿用其它缓冲液和蒸馏水洗涤。
11. 滴加 SABC: 37°C 20min 或室温 30min。0.5M PBS 洗 5min \times 3 次。勿用其它缓冲液和蒸馏水洗涤。
12. 滴加生物素化过氧化物酶: 37°C 20min 或室温 30min。0.5M PBS 洗 5min \times 4 次。
13. DAB 显色: 使用 DAB 显色试剂盒——1ml 蒸馏水加显色剂 A, B, C 各一滴, 混匀, 加至标本上。镜下控制显色, 一般在 30min 内。若无背景出现则可继续显色。也可自配 DAB 显色剂后显色。充分水洗。
14. 必要时苏木素复染, 充分水洗。
15. 酒精脱水, 二甲苯透明, 封片。

二. 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, 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 30-40min, 一般不要超过 1 小时。

1. 常规脱水、浸蜡、包埋。切片厚度 6-8 μm 。
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。3% H_2O_2 室温处理 10 分钟以灭活内源性过氧化物酶。蒸馏水洗涤 2 次。
4. 暴露 mRNA 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°C 或室温消化 3-30min (视标本新旧、厚薄自行调整)。充分的消化可以使 mRNA 得到暴露, 从而增强杂交信号; 但另一方面, 过度的消化又使切片明显减薄乃至消失, 从而失去杂交信号。由于用户的切片情况各不相同, 这就需要用户比较不



同的消化时间，例如 5min, 10min, 20min, 30min。以找到最佳的消化时间。0.5M PBS 洗 3 次×5min。蒸馏水洗 1 次。

其余步骤和冰冻切片 6-15 步相同。

结果观察：阳性细胞的胞浆着色呈棕黄色。

注意事项：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。有其它明显的非特异性染色现象时，可以用预杂交液对含探针的杂交液进行稀释，一般稀释 2-5 倍。