

原位杂交操作方法

(一)、仪器设备

医用微波炉； 水浴锅。

(二)、试剂

0.2mol/L HCl: HCl 8.2ml, H₂O 定容 0.5L。0.1mol/L 三乙醇胺(pH8.0):三乙醇胺 5.33ml, H₂O 定容 0.4L。0.5ml/L 醋酸-2.5ml/L 醋酸酐:三乙醇胺 13.2ml, NaCl 5g, 浓 HCl 4ml, H₂O 定容 0.98L, 醋酸酐 (用前加) 2.5ml。20×SSC(pH7.0): NaCl 175.3g, 枸橼酸钠 88.2g, H₂O 定容 1L。100×Denhardt's: Ficoll 1g, PVP 1g, BSA 1g, H₂O 定容 50ml。杂交液: Formamide 5ml, 20×SSC 2.5ml, Dextran sulfate 1g, 100×Denhardt's 0.5ml, 10%SDS 0.5ml, 10g/L sperm DNA 0.1ml, H₂O 1.4L。Buffer I (pH7.5): 0.1mol/L Tris·Cl, 0.15mol/L NaCl。BufferIII (pH9.5): 0.1mol/L Tris·Cl, 0.1mol/L NaCl, 0.05mol/L MgCl₂。BufferIV (pH8.0): 10mmol/L Tris·Cl, 1mmol/L EDTA。

(三)、操作流程

1、使用地高辛标记的核酸探针进行石蜡切片的 RNA 原位杂交第一天

- 1) 二甲苯于 37℃脱蜡 2 次, 每次 15 分钟;
- 2) 无水乙醇浸泡 2 次, 每次 3 分钟;
- 3) 95%乙醇浸泡 2 次, 每次 3 分钟;
- 4) PBS 清洗 3 分钟;
- 5) 2%焦碳酸二乙酯室温下浸泡 10 分钟;
- 6) PBS 清洗 10 分钟;
- 7) 加入胃蛋白酶 25ul/ml, 37℃孵育 15 分钟;
- 8) PBS 清洗 2 次, 每次 3 分钟;
- 9) 0.2N 的 HCl 孵育 30 分钟;
- 10) PBS 清洗 2 次, 每次 3 分钟;
- 11) 0.25%无水乙酸和 0.1M 三乙醇胺孵育 10 分钟;
- 12) PBS 清洗 2 次, 每次 5 分钟;

- 13) 预杂交缓冲液孵育 30 分钟;
 - 14) 准备核酸探针混合物: 使用预杂交缓冲液稀释探针, 85°C 加热 5 分钟, 置于冰块中 10 分钟;
 - 15) 杂交; 第二天
 - 16) 将玻片置于 SSC 中 2 次, 每次 5 分钟以去除封片;
 - 17) PBS 清洗 3 分钟;
 - 18) RNA 酶 A 溶液中 (或 0.1-1ng/mlPBS 中), 37°C 孵育 30 分钟;
 - 19) PBS 清洗 5 分钟;
 - 20) 室温, 2×SSC 清洗 10 分钟;
 - 21) 37°C, 1×SSC 清洗 10 分钟;
 - 22) 37°C, 0.5×SSC 清洗 10 分钟;
 - 23) 缓冲液 A 孵育 10 分钟;
 - 24) 缓冲液 A (1% 正常绵羊血清和 0.03% 三重氢核 X-100) 孵育 30 分钟;
 - 25) 加入抗地高辛抗体 (1/200 的上述缓冲液, 来自 Boehringer Mannheim), 37°C 孵育 3 小时;
 - 26) 缓冲液 A 清洗 2 次, 每次 10 分钟;
 - 27) 缓冲液 B 清洗 2 次, 每次 5 分钟;
 - 28) 制成 NBT/BCIP 暗处保存 30-60 分钟, 显微镜下进行观察, 如果背景尚佳, 显色时间可延长到 16 小时;
 - 29) 停止缓冲液 B 的反应, 用水进行简单的清洗;
 - 30) 固红, 脱水以及封片进行核的复染。
- 2、使用地高辛标记的寡核苷酸探针进行石蜡切片的原位 DNA 杂交第一天
- 1) 二甲苯于 37°C 脱蜡 2 次, 每次 15 分钟;
 - 2) 无水乙醇浸泡 2 次, 每次 5 分钟;
 - 3) 95% 乙醇浸泡 2 次, 每次 5 分钟;
 - 4) PBS 清洗 5 分钟;
 - 5) 2% 焦碳酸二乙酯室温下浸泡 10 分钟;
 - 6) PBS 清洗 5 分钟;
 - 7) 加入胃蛋白酶 25ul/ml, 37°C 孵育 10 分钟;

- 8) PBS 清洗 2 次, 每次 5 分钟;
- 9) 0.2N 的 HCl 孵育 30 分钟;
- 10) PBS 清洗 2 次, 每次 5 分钟;
- 11) 0.25% 无水乙酸和 0.1M 三乙醇胺孵育 10 分钟;
- 12) PBS 清洗 5 分钟;
- 13) 预杂交缓冲液孵育 30 分钟;
- 14) 准备寡核苷酸探针混合物: 使用预杂交缓冲液稀释探针;
- 15) 杂交: 第二天
- 16) 将玻片置于 SSC 中以去除封片;
- 17) 室温, 2×SSC 清洗 10 分钟;
- 18) 37°C, 1×SSC 清洗 10 分钟;
- 19) 37°C, 0.5×SSC 清洗 10 分钟;
- 20) 缓冲液 A 孵育 10 分钟;
- 21) 缓冲液 A 孵育 30 分钟;
- 22) 加入抗地高辛抗体 37°C 孵育 3 小时;
- 23) 缓冲液 A 清洗 2 次, 每次 5 分钟;
- 24) 缓冲液 B 清洗 2 次, 每次 5 分钟;
- 25) 制成 NBT/BCIP 暗处保存 30-60 分钟, 显微镜下进行观察, 如果背景尚佳, 显色时间可长到 16 小时;
- 26) 停止缓冲液 B 的反应, 用水进行简单的清洗;
- 27) 固红, 脱水以及封片进行核的复染。