

## 原位杂交组织化学常用试剂及处理

### 一、杂交前准备

(一) DEPC 水是经 DEPC 处理过的灭菌蒸馏水。

DEPC 即二乙基焦碳酸酯 (diethylprocarbonate), 可灭活各种蛋白质, 是 RNA 酶的强抑制剂。原位杂交在杂交及其以前的各步处理中, 所有液体试剂都应经 DEPC 处理。方法是: 取市售 DEPC 1ml, 加入 1L 待处理水 (蒸馏水等) 中, 经猛烈振摇后, 于室温静止数小时, 然后高压灭菌, 以除去降解 DEPC (DEPC 分解为 CO<sub>2</sub> 和乙醇)。有些试剂可直接加入 DEPC, 终浓度一般为 0.1%~0.4%, 原则上在杂交及其以前的步骤中, 所有液体试剂均需用 DEPC 处理, 或用 DEPC 水配制, 包括乙醇的稀释。此外, 接触标本以及标本有关的空中的洗涤也需 DEPC 水洗涤。

注意: ①DEPC 是一种潜在的致癌物质, 在操作中应尽量在通风的条件下进行, 并避免接触皮肤。②含有 Tris 缓冲液的溶液中, 不能加入 DEPC。

(二) 载玻片的处理

组织原位杂交, 常在载玻片上进行, 故载玻片的洗涤至关重要, 必须保持清洁, 并且不能有任何核酸的污染。处理方法如下:

(1) 先经洗衣粉浸泡过夜, 次日自来水冲洗后, 泡酸数小时以上, 取出后再用流水冲洗, 双蒸水冲洗 2~3 次, 置 160℃ 以上烤箱中烧烤 4h 以上, 或经 15 磅高压灭菌 20min。经以上处理可清除载片上的核酸酶。

(2) HCl 处理法

(三) 硅化

**【方法 1】**(1) 将一扎新的盖玻片散开, 在通风条件下于 0.1mol/L 的 HCl 中煮 20min, 等其冷却后, 倒掉盐酸。

(2) 用去离子水沉漂洗玻片, 竖放在架子上自然干燥。

(3) 硅化盖玻片: 通风条件下, 将单块的盖玻片在二甲二氯硅烷 (dimethyldichorsilane, DMDC) 液中浸几下, 竖入在架子上干燥。

(4) 收集干燥的盖玻片于一能耐热的 petri 氏盘 (或培养皿) 中, 用去离子水漂洗数次, 彻底清洗。

(5) 用铝箔将装有盖玻片的培养皿包好, 于 180℃ 烘烤 4h 过夜。取出待冷

至室温后，即可进行后续处理。

附：2%DMDC

配制：按比例两者充分混匀，静止待气泡消失即可使用。

用途：硅化玻片（载片、盖片均可）。

【方法 2】将经过洗净的玻璃盖片分散开放在一金属网中，并将该网放入一接有真空泵的干燥器中。同时，在干燥器中放一盛有约 1m 二甲二氯硅烷（dimethyldiorosilane,DMDC）的小烧杯。盖好干燥器（确保密闭），抽真空约 5min，然后让空气冲入。取出盛有盖片的金属网架，用锡箔纸包埋，于 250℃ 以上烘烤 4h 以上，最好过夜。冷却后备用。

本法可用于玻璃及塑料器皿的硅化。塑料器皿只能于 60℃ 烧干。

【方法 3】APES（氨丙基三乙氧基硅烷）法

【方法 4】

- （1）49ml 氯仿与 1mg 二甲二氯硅烷（DMDC）配液；
- （2）倒入每个拟硅化的试管或离心管中，浸泡 5min 后用乙醇或重蒸水冲洗；
- （3）玻璃器皿使用前位于 180℃ 以上烘烤 2h 以上，塑料器皿应于 60℃ 烘烤过夜。

注意：DMDC 有毒且高度挥发，应于通风环境操作并戴口罩、手套，避免接触皮肤或吸入。

（四）载片的包被（粘贴）

1. 沾附剂

（1）多聚赖氨酸(poly-L-Lycine,PLL)

储备液（0~5%）

按上述剂量充分混合，即为浓度为 5mg/ml(0.5%)的 PLL 液。常分装成 1ml 的包装，-20℃ 存放。该液为储备液，可反复冻融，无明显影响。用前充分混合。

工作液（0.01%）：

充分混合，静止待气泡消失。

（2）明胶液

配法：先称取明胶溶于 500~800ml DEPC 水中，加热搅拌助溶，待明胶完全溶解以后，加入甲明矾溶解后即可使用。注意，包被玻片时，明胶液温度最好

保持在 60℃左右，效果最佳。方法同 PLL 包被玻片。

## 2. 多聚赖氨酸包被玻片的制备方法（其它包被剂相同）

（1）将事先准备好的经 160℃以上烘烤，并冷却至室温的玻片（载片或盖片），在 0.05%（也有用 0.1%）的 PLL 液中上下浸蘸几下，分散开竖放在架子上，于空气中自然干燥，4℃备用。注意：①浸蘸时，务必使整个玻片完全浸于液体中，否则，包被不全会产生标本脱落现象；②干燥过程中注意避免尘埃污染；③按上法处理的玻片通常可存放在一定时间（室温 1 月以上，4℃更长），但仍建议尽早使用。

（2）多聚赖氨酸 1mg 溶于 10ml 灭菌的去离子水或 1mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液中（pH7.0），将其涂布于玻片上，待干燥后即可使用。该法包被的玻片可用于细胞涂片和切片。

（3）将 PLL 工作液滴至盖玻片上 5 $\mu$ l/片，用另一盖玻片以推血涂片方法推片，或用另一盖玻片紧贴于其上，相互磨擦以使两盖玻片相对的一面涂布上 PLL。该法制备的玻片，只有一面是包被有 PLL，故制备时，待其晾干后，应作好记号，然后保存后备用。

多聚赖氨酸可用于多种核酸杂交，方法简单，结果可靠，有许多其它方法不可比拟的优点。配制好的液体可存放于 4℃或室温，但时间过长会解聚而失效，故建议使用时尽量新鲜配制。

## （4）Vectabond 粘附剂

该试剂是 Vector 公司新近推出的一种新型粘附剂。它与其它粘附剂的主要区别是：一般的粘附剂是通过物理性覆盖在玻片表面，天长日久，可能由于包被不完全或局部脱落而致切片等标本易于脱落。而 Vectabond 试剂是通过化学性作用，改变玻璃表面的分子结构，使标本贴附牢固，不易脱落，且保持时间长久，耗量小，价格便宜，一个包装 7ml 可配成 350ml 工作液使用。操作程序：

标本（铺片、切片等）→丙酮（5min）→Vectabond 试剂工作液（5min）→dH<sub>2</sub>O(2×5min)→干燥（温箱，数小时过夜）→用铝箔包好，室温备用。

注意：制备和保存过程中避免污染。

经上述处理的载玻片一般可存放半年以上（4℃可更长）。

## （五）硅鱼精子 DNA 的制备

(1) 在 50ml 灭菌聚乙烯管中加入 1g 鲑精 DNA，加入 15ml DEPC 水使其浸泡 5min 至 2h；

(2) 加入 2.5ml 2mol/L HCl，室温放置，DNA 形成白色沉淀，充分振摇至沉淀物相互缠绕在一起，用吸头尖端使之形成一球团状 (2~3min)；

(3) 加入 5.0ml 2mol/L 的 NaOH。摇动小管使 DNA 悬浮、溶解，将小管置 50°C 15min 助溶；

(4) 用 DEPC 水将混合物稀释至 175ml (总体积)，充分混合，注意确保管内已无颗粒状；

(5) 加入 20ml/1 1mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH7.4)；

(6) 用 2mol/L 的 HCl 滴定至 DNA 溶解 pH 为 7.0~7.5；

(7) 用无菌微孔滤膜过滤液体，去除颗粒。260nm 测定溶液的 OD 值，方法是：取 20 $\mu$ l DNA 液混合于 980 $\mu$ l 水中，混匀后测定，吸收值乘以 50 即为 DNA 浓度 ( $\mu$ g/ml)；

(8) 制备好的 DNA 液储于 -20°C 备用，用前取出冻融后煮沸。

## 二、关于探针的标记

### (一) cRNA 探针的同位素标记

#### 1. 标记液 (转录标记)

#### 2. 转录缓冲液

※：用地高辛或生物素标记时，用 UTP 替代。

#### 3. 标记终止液

#### 4. 标记探针水解液

先用 dH<sub>2</sub>O 悬浮探针，再加入后两种试剂，轻轻振摇混合，于 60°C 条件下反应。

#### 5. 探针水解时间

注：LO—探针初始长度 (kb)

Lf—探针的终长度 (kb)

K—0.11kb/min

#### 6. 探针水解终止液

每次加入充分混合，临用前配。

## 7. 探针沉淀液

每次加入，充分混合，新鲜配制。

### (二) 寡聚核苷酸 3'端标记 (cRNA 探针)

#### 1. 标记反应液

#### 2. 终止液: 0.2mol/L EDTA

#### 3. 探针沉淀液

### (三) cRNA 探针非同位素标记 (地高辛及生物素)

#### 1. 标记液

△: 生物素标记时为 10mmol/L 的生物素-11-UTP

※: 为检测标记率而加。

#### 2. 转录标记终止液

(1) 0.2mol/L EDTA: 用于地高辛标记法

(2) 生物素标记终止液

### (四) DNA 探针标记常用试剂的配制

(1) 10 × 缺口平移缓冲液: 200mmol/l Tris-HCl, pH7.4 含 50mmol/L MgCl<sub>2</sub>; 100mmol/L β-巯基乙醇、1mg/ml BSA。

(2) 缺口平移反应终止液: 200mmol/L NaCl; 10mmol/l Tris-HCl, pH7.4; 11mmol/L EDTA; 0.5% SDS。

(3) DNase I : 干粉状 DNase I (2000~3000u/mg) 溶于 20mmol/l Tris-HCl, pH7.5 中 (1mg/ml), 10μl 分装, -20℃ 保存一年。

(4) 10×DNA 聚合酶 I (Klenow 片段) 缓冲液: 500mmol/l Tris-HCl, pH6.6; 100mmol/L Mg—Cl<sub>2</sub>; 10mmol/L DTT; 0.5mg BSA。

(5) 10×激酶缓冲液: 500mmol/L Tris-HCl, pH7.4, 50mmol/L MgCl<sub>2</sub>; 20mmol/L DTT; 1.0mmol/L 亚精胺。

(6) 10×随机引物标记缓冲液: 500mmol/l Tris-HCl, pH6.6; 100mmol/L MgCl<sub>2</sub>; 10mmol/L β-巯基乙醇; 500μg/ml BSA。

(7) 1×加尾缓冲液: 100mmol/L 二甲胍化钾, pH7.0, 1mmol/l CoCl<sub>2</sub> 0.2mmol/L DTT。

(8) 1mol/L MgCl<sub>2</sub>: MgCl<sub>2</sub> 47.60g 溶于 500ml 水中, 100ml 分装, 高压灭菌,

室温保存。

(9) 0.25mol/L EDTA(Ph8.0):EDTA 52.02g 溶于 400ml 水中, 调 pH 至 8.0, 加水至 500ml, 100ml 分装, 高压灭菌, 室温保存。

(10) 4mol/L 醋酸钠: 取无水醋酸钠 82g 溶于 200ml 水中, 用醋酸调 pH 至 6.5, 加水至 250ml, 高压灭菌, 或 0.45 $\mu$ m 膜过滤, 室温保存。

(11) 10% SDS: 10g SDS (十二烷基硫酸钠) 溶于 50ml 水中, 加水至 100ml, 分装后室温保存。

(12) 20 $\times$ SSC: 取 NaCl 175.3g;柠檬酸钠 88.2g;加水至 1000ml, 用 10mol/l NaOH 调 pH 至 7.0; 高压灭菌, 室温保存。

(13) 无菌水: 100ml 去离子水或双蒸水, 分装, 高压灭菌, 室温保存, 开瓶后仅限一周使用。

(14) 10 $\times$ 激酶缓冲液: 500mmol/L Tris-HCl,pH7.4;100mmol/L MgCl<sub>2</sub>;50mmol/L DTT;10mmol/L 亚精胺 (非必需)。

(15) T4 多聚核苷酸激酶: 10u/ $\mu$ l, 保存在甘油中, -20 $^{\circ}$ C。

(16) TE 缓冲液 (Tris/EDTA): Tris,10mmol/l pH7.4(0.5ml 2mol/L 贮存液), 1.0mmol/l ED-TA,pH8.0(20 $\mu$ l 0.5mol/L)贮存液, 加水至 100ml, 室温保存。

(17) 2mol/L Tris-HCl pH7.4:Tris242.2g 溶于 850ml, 加浓 HCl 75ml ,边加边缓慢搅动, 至 pH7.4,于加水至 1000ml。

(18) 1mol/L DTT(二硫苏糖醇): 3.0g DTT 溶于 20ml 水中, 分装, 于-20 $^{\circ}$ C 贮存。

(19) 0.5mol/L EDTA (乙二胺四乙酸二钠盐): 在烧杯中先加入 300ml 水, 加入 93.5g EDTA-Na<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O,充分混匀, 加 10mol/l NaOH 调 pH 至 8.0,加水至 500ml。

(20) 10mol/L NaOH: 200g NaOH 溶于 450ml 水中, 混匀, 再加水至 500ml。

(21) 5mol/L NaCl: 292.25g NaCl,加水至 1000ml。

(22) 1mol/L HCl: 加 86.2ml 浓盐酸至 913.8ml 水中。

(23) 1mol/L CaCl<sub>2</sub>: 147g CaCl<sub>2</sub>· 2H<sub>2</sub>O,溶于 1000ml 水中,高压灭菌,室温保存。

### 三、固定剂

进行原位杂交的组织或细胞标本常需经固定处理。尽管许多化学物质对组织/细胞有固定作用，但核酸原位杂交的理想固定液应具备如下特点：①能很好地保持组织细胞的状态；②对核酸无抽提、修饰及降解作用；③不改变被检核酸分子在组织细胞内的定位；④对核酸及探针的杂交过程无阻碍作用；⑤固定液本身对杂交信号无遮蔽、掩盖作用，如不使本底增加等；⑥理化性质稳定、价格低廉。

### 1. 4%多聚甲醛 (Paraformaldehyde,PFA)

配法：称取 40g PFA 溶于装有 500ml DEPC 水的玻璃容器（烧杯或烧瓶）中，持续加热磁力搅拌至 60~65℃，使成乳白色悬液。用 1.0mol/L 的 NaOH 值至 7.0，使呈清亮状（滴加），再加入约 500ml 2×PBS※，充分混匀（在冰浴或冷水浴中），可再检测一下 pH，过滤后定容至 1000ml，室温或 4℃ 保存备用。

注意：①配制时应在通风条件下操作，并避免接触皮肤和吸入（戴手套及口罩），因 PFA 有较强的固定作用及毒性，对粘膜及皮肤有固定及毒性，刺激作用；②加热时，温度不宜过高，常为 60~65℃，否则，PFA 降解失效；③配制好的 PFA 虽可存放一定时间，但过久的液体，固定效果下降，建议尽早使用。

附：固定液用 PBS 的配制：

配法：按上述比例称取试剂，溶于 DEPC 水（也可用蒸馏水加 DEPC）500~800ml 中，过滤后，加水定容至 1000ml，高压灭菌。通常配制成 10×PBS 的储备液，2×PBS 和 1×PBS 可用 DEPC 水稀释获得。

除用 DEPC 水配制 PFA 外，也有用灭菌蒸馏水或经 DEPC 处理的 0.01~0.1mol/L 的 PBS 配制的，方法及注意事项同上。

4% PFA 是目前原位杂交组织化学技术中最常用的固定液，它能较好地保持组织及细胞内的 RNA，同时对形态保持也较好。通常组织块固定 4~12h，载片固定时间在 10~15min 以内，RNA 含量较为恒定。过度延长固定时间会引起细胞内生物大分子的过度交联，影响探针的穿透力，降低杂交效率。

### 2. 甲醛

#### ①10%甲醛 (Formaldehyde,FA)

量取二者充分混合而可。较适于检测 RNA 的组织及细胞固定，也可用于新鲜冰片切片后固定。

#### ②10%福尔马林试剂：

较适于固定细胞。

③10%中性福尔马林

市售甲醛	100ml
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6.5g
DEPC 水	~1000ml

常用于石蜡样品切片的固定。

10%的甲醛由于有促进 DNA 双链分子交联的作用，干扰 DNA 变性，故不适于 DNA 杂交。在组织或细胞原位杂交中，可通过使用含 50%甲酰胺的杂交液使 DNA 变性解链而解决。这类固定液在 DNA/RNA 杂交中有较好的效果。

3. 4%戊二醛效果较 40%差。

4. 0.1%戊二醛常用于固定组织，适于新鲜组织冰冻切片及石蜡切片的后固定，常用于检测 DNA 的原位组织杂交方法。

5. 乙醇/醋酸（或冰醋酸）将乙醇与醋酸按 3: 1 的体积比充分混合即可。该液较适于固定细胞的原位杂交，尤其检测 DNA 时。

乙醇/醋酸虽广泛应用于原位杂交中，但 RNA 保留较差，可本底很低，即背景染色淡。

6. 甲醇/醋酸（3: 1）用前按体积比 3: 1 比例充分混合即可。

7. 甲醇/丙酮（1: 1）适于培养细胞的原位杂交技术。

8. 4%多聚甲醇-0.5%~1%戊二醛溶液在 pH7.4 磷酸缓冲液中，用于免疫电镜样品固定。

#### 四、LB 培养基

##### （一）液体 LB 培养基（Luria-Bertani 培养基）

配制：取一 1000ml 的烧杯，将事先称取好的试剂加入杯内，加 H<sub>2</sub>O 约 500~800ml 搅拌使其溶解完全。用 5N 的 NaOH 调 pH 至 7.0,加入 H<sub>2</sub>O 定容至 1000ml。15 磅高压灭 20min。

##### （二）琼脂糖平板培养基

细菌培养用琼脂（或琼脂糖）	15g
液体培养基（如 LB）	~1000ml



按浓度比例，将琼脂加入液体培养基（如 LB）中，稍加搅拌，用纱布或纸封好瓶口，15 磅高压灭菌 20min。

#### 五、小量质粒提取主要液体

##### 1. 溶液 I

##### 2. 溶液 II

##### 3. 溶液 III（3mol/L 醋酸钠）

加热溶解后，再用冰醋酸（约 40ml）调 pH 至 4.8，补足 H<sub>2</sub>O 至 200ml。

#### 六、杂交前处理

1. 蛋白酶（Proteinase K, Pro.K）蛋白酶 K 主要用于杂交前标本处理，其作用是使组织达到一定消化，利于检测分子的穿透，从而提高检测方法的敏感性，但各种组织在不同条件下消化程度不一，因此，具体应用时，应根据组织种类、温度确定反应时间及酶的浓度。过度消化可使组织形态结构遭到明显破坏，核酸分子也会受到影响。通常是将其配成储备液（1mg/ml），临用前，再配成工作液（约 0.025mg/ml）。配制方法：

精心称药，将二者充分混合后，分装成小份，-20℃ 存放，用时再取出冻融，余者弃去。

##### （2）工作液（临用前配）：

取储备液（1mg/ml）按 1：40 稀释，充分混合，即得约含 Pro.K 为 25mg/ml 的工作液。

##### （3）关于 P-K 缓冲液的配制：

称取上述试剂，充分混合即可。

##### ② 1mol/L 的 Tris-HCl(pH8.0)：

先将 Tris 于 800ml ddH<sub>2</sub>O 中溶解，用 HCl 将 pH 调至 8.0，ddH<sub>2</sub>O 定溶于 1000ml，高压灭菌，室温备用即可。

##### ③ 0.5mol/L 的 EDTA：

称取 EDTA 溶于约 600ml ddH<sub>2</sub>O 中，常需 60℃ 持续搅拌以助溶，滴加 NaOH 至 pH 接近 8.0 时，EDTA 才开始溶解。待完全溶解后，冷却至室温，NaOH 调 pH 至 8.0，ddH<sub>2</sub>O 定溶至 1000ml，高压灭菌，室温备用。

#### 2. 甘氨酸

### (1) 1mol/L 甘氨酸:

称取甘氨酸 75g 溶于 ddH<sub>2</sub>O 或 DEPC 水中,最后补足 ddH<sub>2</sub>O 定容至 1000ml,高压灭菌备用。该液为储备液, -20℃ 储存。

### (2) 甘氨酸工作液 (0.1mol/L):

将二者按 1: 10 比例稀释, 即得甘氨酸工作液。一般要求临用前新鲜配制。甘氨酸有终止蛋白酶 K 作用的作用, 以防过度消化。

### 3. 0.25%醋酸-0.25%醋酸酐

配制: 按上述配方, 先以少许 DEPC 水溶解 NaCl, 然后加入三乙醇胺及浓 HCl。DEPC 水定容至约 1000ml(997.5ml), 临用前, 一边摇动溶液一边加入醋酸酐, 充分混合。注意操作时避免浓 HCl 溅出, 最好在通风条件下进行。

生物体内有些组织, 如神经组织中的蛋白质, 对带负电荷的核酸探针较易吸附。经该液乙酰化处理后, 可使切片标本表现带上负电荷, 有排斥带负电的核酸探针, 减少非特异吸附, 降低反应背景的作用。

### 4. RNA 酶溶液

取 RNA 酶 A 溶解于 100ml DEPC 水中, 分装成小份 (1ml,10mg/ml), -20℃ 储存。

临用前, 取 RNA 酶 A 储备液, 用 2×SSC 溶解配成工作液 (0.01mg/ml)。

### 5.0.2%

取 2ml Triton X-100 加入 998ml PBS 中, 充分振荡使其充分混合。

## 七、杂交用液

### 1. SSC (Standard Saline Citrate, SSC)

通常配成 10×, 20×, 50×的储备液, 如下:

配制: 先称取上述两种试剂, 溶于约 800ml ddH<sub>2</sub>O 中, 滴加 10N 的 NaOH, 将 pH 值调至 7.0, 补足 ddH<sub>2</sub>O 至 1000ml, 加入终浓度为 0.1%~0.2%的 DEPC, 分装后高压灭菌, 可室温保存。

该液主要用于配制予杂交液及杂交后的各种洗脱液, 以保持一定的离子强度。此外, 在用于杂交的湿盒内也常用 5×的 SSC 以保持一定湿度。

### 2. Denhardt's 液

通常配成 10×, 50×或 100×的储备液

配制：称取上述试剂，溶于 800ml 左右灭菌 ddH<sub>2</sub>O 中，定容至 1000ml 后，过滤后于 -20℃ 保存备用。

该液用于配制杂交液及予杂交液等。

### 3. 杂交液及予杂交液

※：临用前加；△予杂交液不加

配制：先以去离子甲酰胺与 SSC 于室温混合，加入硫酸葡聚糖于 50℃ 促溶，依次加入其它成份。硫酸葡聚糖在室温常需数小时才能完全溶解。有时需漩涡振荡。定容后充分混合。根据使用方便可分装（最好用铝箔将瓶子包好）存于 4℃，可达数月。注意，杂交缓冲液在使用前切忌污染。

变性被打断的无关 DNA（常为鲑精 DNA 或鲱精 DNA）可在予杂交及杂交前加入。此外，有许多物质如肝素、多聚腺苷酸、醋酸钠等多种成份，可根据需要加入杂交液中，上述配方所列只是不可缺少的基本成份。

配制好的杂交液不宜反复冻融，否则易产生硫酸葡聚糖沉淀现象。使用前最好加热至 50℃，使其充分溶解后再加入探针分子。至于探针的浓度视实验目的、探针类型及标记方法而异。通常 RNA 探针分子浓度为 0.5~2μg/ml，DNA 探针浓度为 1μg/ml，此外，如使用 35S 标记的探针，还需加入终浓度为 100mmol/L 的二硫苏糖醇（Dithiothreitol, DTT）至杂交液及杂交后的洗脱液中。

### 八、杂交后漂洗溶液

无论用何种标记方法及何种信号显示方法，在杂交后洗脱则是大同小异。在此，归纳几种带有共同性及常用的洗脱液。

该液常用于杂交后的初次洗脱，故离子强度（张力）较高。

该液常用于杂交后的第二次洗脱，离子强度较低，经过上述两套洗脱液洗后，有的还可用 2×SSC，10%（0.1%）SDS 洗脱。

主要是洗去残留的 RNA，降低背景。用于以 RNA 为探针的原位杂交方法中。

### 4. Dig 标记探针杂交后处理液

用 ddH<sub>2</sub>O 溶液并定容至 1000ml。

用 ddH<sub>2</sub>O 溶解并定容至 1000ml。

配制同上。

左旋咪唑有消除内源性磷酸酶的作用。

## 九、原位杂交信号显示

目前应用原位杂交方法中，信号的显示主要有放射自显影，酶底物及免疫金银等方法，在此归纳有关的主要试剂。

### 1. A-B 显影液

称取上述试剂，按配方分别溶于 50ml ddH<sub>2</sub>O 中，于显影前，在室温将两者（A 液及 B 液）按 1: 1 混合，稍加摇动促进混合，即可将贴有切片标本的切片放入显影液，于室温避光（可暗室）反应 5~15min。显影时间和温度相关，需自己根据情况摸索。终止反应只需将显影液倒出，自来水冲洗即可。倒出的 AB 显影液可暂时不扔，光镜下观察，若明显显影不够，还可重新或继续显影。AB 显影液要求临用前配制，在显影时才将 AB 二液混合。否则，A 液过久会产生黄色沉淀，增加背景。

AB 液用于免疫金银法中，使金标记颗粒信号放大，形成棕黑色沉淀。

### 2. DAB-H<sub>2</sub>O 显色液

配制方法见附录一。

该液用于标本被标记上辣根过氧化物酶（HRP）的方法。产物为棕黄色。

### 3. NBT-BCIP 显色液

配制方法，详见附录一。

该液用于有碱性磷酸酶标记物的方法中。产物为紫蓝色。

### 4. Kodak D-19 显影液

配制：先将 500ml 水中加温 50℃，按上述配方顺序加药，同时充分搅拌，每加一种药完全溶解后，再加另一种药品，否则，所配的显影液易产生混浊而效果差，最后补足水至 1000ml 充分混合，室温或 4℃ 避光保存。最好包上纸。

该液用于放射自显影时的显影。

### 5. Kodak F-5 定影液（酸性坚膜定影液）

※：28%醋酸为 3 份冰醋酸和 8 份水混合液。

配制：同 Kodak D-19 显影液。