



Bcl-2 原位杂交检测试剂盒

产品编号: MK1050-r

保存: 置 4℃。

工作量: 100 张切片。

有效期: 一年。

本试剂盒采用针对 Bcl-2 的寡核苷酸探针, 经地高辛标记。由于采用多相寡核苷酸探针和高敏感标记技术, 并配合使用敏感性加强型的原位检测方法, 具有敏感性特别高, 背景清晰, 结果准确可靠的优点。针对 Bcl-2 靶基因的序列为:

(1) 5' — GATGA AGTAC ATCCA TTATA AGCTG TCGCA — 3' ;

(2) 5' — GCGCT CAGCC CGGTG CCACC TGTGG TCCAC — 3' ;

(3) 5' — GGGAG ATGTC GCCCC TGGTG GACAA CATCG — 3' ;

适用种属: 大鼠组织。

试剂盒中内容:

1. 胃蛋白酶 (×10; Pepsin) 2ml;
2. 预杂交液 2ml;
3. Bcl-2 寡核苷酸探针杂交液 2ml;
4. 封闭液 5ml;
5. 生物素化鼠抗地高辛 5ml;
6. SABC-POD 5ml;
7. 生物素化过氧化物酶 5ml。

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:

固定液:

4%多聚甲醛/0.1 M PBS (PH7.2-7.6);

1%多聚甲醛/0.1 M PBS (PH7.2-7.6)

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。

原位杂交用 PBS (1000ml 蒸馏水加氯化钠 30g, Na₂HPO₄·12H₂O 6g, NaH₂PO₄·2H₂O 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 酶对核酸的分解作用。此外, 过度固定对原位杂交有明显的不良影响。

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。细胞长好后 0.1M PBS(PH7.4)洗 2min×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 20-30min。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，室温处理 30min。蒸馏水洗涤 3 次。
5. 暴露核酸片段：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×5min。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 10min；或者 4%多聚甲醛/0.1 M PBS（pH7.2-7.6），含有 1/1000 DEPC，室温固定 5min。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 20μl 加预杂交液。恒温箱 38-42℃ 2-4 小时。吸取多余液体，不洗。
8. 杂交——按每张切片 20μl 杂交液，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℃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℃左右水温的 2×SSC 洗涤 5min×2 次；37℃ 0.5×SSC 洗涤 15min×1 次；37℃ 0.2×SSC 洗涤 15min×1 次(如果有非特异性染色，重复 0.2×SSC 洗涤 15min×1-2 次)。
10. 滴加封闭液：37℃ 30min。甩去多余液体，不洗
11. 滴加生物素化鼠抗地高辛：37℃ 60min 或室温 120min。原位杂交用 PBS 洗 5min×4 次。勿用其它缓冲液和蒸馏水洗涤。
12. 滴加 SABC：37℃ 20min 或室温 30min。原位杂交用 PBS 洗 5min×3 次。勿用其它缓冲液和蒸馏水洗涤。
13. 滴加生物素化过氧化物酶：37℃ 20min 或室温 30min。原位杂交用 PBS 洗 5min×4 次。
14. 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，阳性着色为棕黄色。也可自配 DAB 显色剂后显色。充分水洗。
15. 必要时苏木素复染，充分水洗。
16. 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/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 30-40min，一般不要超过 1 小时。

1. 常规脱水、浸蜡、包埋。切片厚度 6-8μm。
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%H₂O₂ 1 份+蒸馏水 10 份混合，室温 5-10min 以灭活内源性酶。蒸馏水洗 3 次。
4. 暴露核酸片段：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 3-30min（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 5min，10min，20min，30min。以找到最佳的消化时间。原位杂交用 PBS 洗 3 次×5min。蒸馏水洗 1 次。

其余步骤和冰冻切片 6-16 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。