

# 地高辛 (DIG) 原位杂交试剂盒

## Digoxin In Situ Hybridization Kit

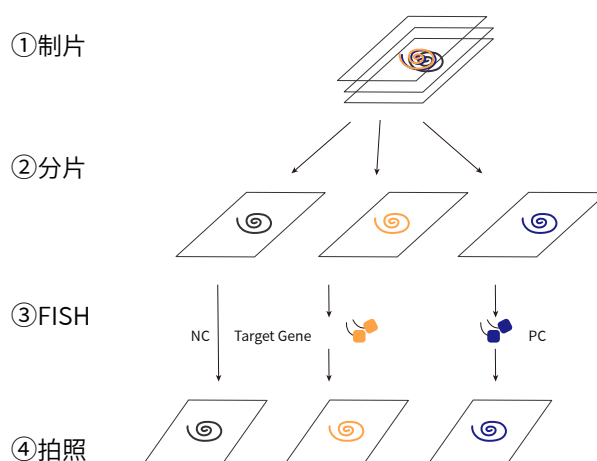
注:本产品干冰运输;试剂按说明书分别保存于4°C及室温,保质期12个月。

序号	试剂	货号及规格			储存
		IFH016 (30T)	IFH016M (50T)	IFH016L (100T)	
01	胃蛋白酶	30 $\mu$ L	50 $\mu$ L	100 $\mu$ L	4°C
02	柠檬酸水	0.75mL	1.25mL	2.5mL	4°C
03	封闭液	1.2mL	2mL	4mL	4°C
04	预杂交液	1.2mL	2mL	4mL	4°C
05	生物素化地高辛	0.9mL	1.5mL	3mL	4°C
06	SABC	0.9mL	1.5mL	3mL	4°C
07	生物素化过氧化物酶	0.9mL	1.5mL	3mL	4°C
08	水溶性封片剂	0.9mL	1.5mL	3mL	4°C
09	洗液 I 原液	24mL	40mL	80mL	4°C
10	洗液 II 原液	24mL	40mL	80mL	4°C
11	洗液 III 原液	24mL	40mL	80mL	4°C
12	洗液 IV 原液	24mL	40mL	80mL	4°C
13	杂交液	1.2mL	2mL	4mL	-20°C

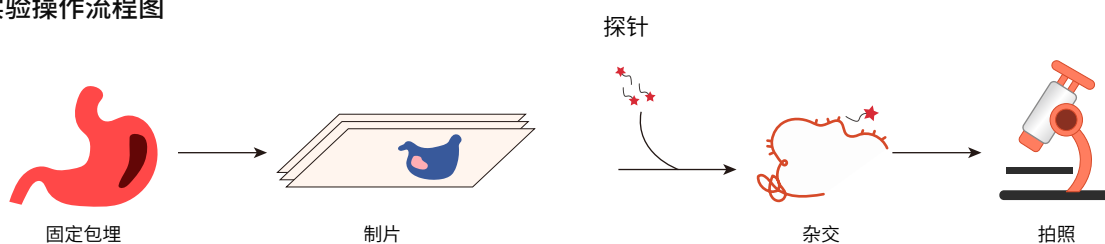
14	AEC显色液-A液	60μL	100μL	200μL	-20℃
15	AEC显色液-B液	60μL	100μL	200μL	-20℃
16	苏木素染液	7.5mL	12.5mL	25mL	RT
17	0.1%盐酸溶液	7.5mL	12.5mL	25mL	RT
18	封片膜	50张	100张	150张	—

## 技术路线/Technology mapping

### 1. 技术路线图



### 2. 实验操作流程



## 使用流程/Procedure

### 1. 样本前处理及制片

#### (1) 石蜡切片 / 组织芯片

①脱蜡：将石蜡切片置于二甲苯中，浸没脱蜡 3 次，每次 5min；

**注意：脱蜡前将切片置于烘片机上，56℃ 烘片 30min，使蜡软化；**

②复水：切片浸入无水乙醇，室温浸泡 10min；依次经 90%、80%、70% 乙醇梯度复水，每个梯度 5min。

③洗涤：蒸馏水洗涤 2 次，每次 5min。

④灭活内源性酶：30% 双氧水与蒸馏水按 1:9 比例配制工作液，室温处理切片 10min；蒸馏水浸洗 3 次，每次 5min。

⑤消化：胃蛋白酶与柠檬酸水按 1:25 比例配制工作液，切片滴加工作液，37℃水浴锅消化 10min；蒸馏水

蒸馏水洗涤 3 次，每次 5min。

**注意：胃蛋白酶工作液总体积 = 切片数 × 20μL。**

## (2) 冰冻切片

①烘片及固定：从 -80°C 取出冰冻切片，快速转移至预热的烘片机，45°C 烘片 10~15min；切片浸入 4°C 预冷的 90% 乙醇，室温固定 20min；室温静置干燥。

②灭活内源性酶：30% 双氧水与蒸馏水按 1:9 比例配制工作液，室温处理切片 10min；蒸馏水浸洗 3 次，每次 5min。

③消化：胃蛋白酶与柠檬酸水按 1:25 比例配制工作液，切片滴加工作液，37°C 水浴锅消化 10min；1×PBS 洗涤 3 次，每次 5min。

**注意：胃蛋白酶工作液总体积 = 切片数 × 20μL。**

④再固定：1% 多聚甲醛室温固定 10 min；1×PBS 清洗切片 1 次，5min。

## (3) 细胞爬片

①固定：细胞爬片置于 6 孔板中，加入 4% 多聚甲醛，室温固定 30min；蒸馏水室温洗涤 2 次，每次 5min；每孔加入 1mL DEPC 水洗涤 2 次，每次 5min。

②灭活内源性酶：30% 双氧水与蒸馏水按 1:9 比例配制工作液，室温处理切片 10min；蒸馏水浸洗 3 次，每次 5min。

③消化：胃蛋白酶与柠檬酸水按 1:25 比例配制工作液，爬片滴加工作液，37°C 水浴锅消化 10min；蒸馏水洗涤 3 次，每次 5min。

**注意：胃蛋白酶工作液总体积 = 切片数 × 20μL。**

④再固定：1% 多聚甲醛室温固定 10 min；1×PBS 清洗切片 1 次，5min。

## (4) 细胞涂片

①固定：细胞沉淀中加入 4% 多聚甲醛，充分悬浮后，室温固定 20min；加入 1mL DEPC 水洗涤 2 次，每次 5min。

②涂片：根据细胞量添加适量的 1×PBS，使细胞终浓度为  $10^6$  个 /mL；玻片上每个杂交区域滴加 10μL 细胞悬液，涂抹均匀；将涂好的玻片移至预热的烘片机，56°C 烘片 30min。

③灭活内源性酶：30% 双氧水与蒸馏水按 1:9 比例配制工作液，室温处理涂片 10min；蒸馏水浸洗 3 次，每次 5min。

④通透：胃蛋白酶与柠檬酸水按 1:25 比例配制工作液，涂片滴加工作液，37°C 水浴锅消化 10min；蒸馏水洗涤 3 次，每次 5min。

⑤再固定：1% 多聚甲醛室温固定 10 min；蒸馏水洗涤 2 次，每次 5min。

**注意：胃蛋白酶工作液总体积 = 切片数 × 20μL。**

## 2. 杂交

①预杂交：玻片置于玻片架风干；滴加 20~40μL 预杂交液，覆盖封片膜，37°C 预杂交 2~4h；

**注意：**

1. 风干时间约为 10 ~ 20min；

2. 预杂交液用量视样本大小而定；

3. 滴加预杂交液后保持载玻片湿润，否则会引发非特异性结合信号。

②配制杂交体系：在预杂交的同时配制杂交反应液：将探针与杂交液按 1:39 比例配制杂交工作液（参考体系：1μL 探针 + 39μL 杂交液），充分混匀，迅速置于冰上；

**注意：**

1. 单探针为 1μL 探针 + 39μL 杂交液，双探针为 1μL 探针 A + 1μL 探针 B + 38μL 杂交液，如此类推，体系可依照实际情况改变浓度；

2. 杂交液应提前拿出恢复至室温后再使用。

③杂交：揭去封片膜，轻轻甩干预杂交液；滴加 20~40μL 杂交反应液于待测样本上；盖膜后 75°C 共变性

5~10min; 快速转移至 37°C杂交过夜 (16h~20h);

④洗涤: 42°C预热的洗液 I、洗液 II、洗液 III、洗液 IV各洗涤 1 次, 每次 5min;

### 3. 封闭

①用纸巾将组织周围的水渍轻轻擦拭干净, 滴加 20~40 $\mu$ L 封闭液, 覆盖封片膜, 37°C封闭 30min; 原位杂交 PBS 洗涤 4 次, 每次 5min。

**注意: 洗涤缓冲液必须为原位杂交 PBS。**

### 4. 生物素化地高辛

①用纸巾将组织周围的水渍轻轻擦拭干净, 滴加 10~30 $\mu$ L 生物素化地高辛, 覆盖封片膜, 37°C免疫反应 60 ~ 120min; 原位杂交 PBS 洗涤 4 次, 每次 5min。

**注意:**

1. 生物素化地高辛用量视样本大小而定;

2. 洗涤缓冲液必须为原位杂交 PBS;

### 5. SABC

①用纸巾将组织周围的水渍轻轻擦拭干净, 滴加 10~30 $\mu$ L SABC, 覆盖封片膜, 37°C结合 30min;

②原位杂交 PBS 洗涤 3 次, 每次 5min。

### 6. 生物素化过氧化物酶

①用纸巾将组织周围的水渍轻轻擦拭干净, 滴加 10~30 $\mu$ L 生物素化过氧化氢酶, 覆盖封片膜, 37°C反应 30min;

②原位杂交 PBS 洗涤 3 次, 每次 5min。

### 7. 显色 -AEC

①AEC 显色液 A、B 与水按 1:1:18 比例配制显色工作液; 用纸巾将组织周围的水渍轻轻擦拭干净, 滴加 20~40 $\mu$ L AEC 显色工作液, 显微镜下观察预显色结果。

**注意:**

1. 显色工作液用量视样本大小而定, 应完全浸润杂交区域, 无需盖膜;

2. 配制及滴加 AEC 工作液时需避光操作;

3. 如显色完毕, 立即加水终止显色反应。

### 8. 染核

轻轻甩掉玻片多余水渍, 滴加适量 苏木素染液, 染色 10s 左右; 流水冲洗, 自来水浸泡 10min 左右, 显微镜下观察显色结果。

**注意:** 如过染, 则用 0.1% 盐酸溶液分化数秒 (一般滴加分化液后即可洗去), 流水冲洗后再观察结果。

### 9. 封片与拍照

10~30 $\mu$ L 水溶性封片剂进行封片, 光学显微镜下观察拍照。

**注意: 封片剂需提前置于 37°C预热至液态。**

## 注意事项/Notes

1. 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内;

2. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

