

D 型原位杂交检测试剂盒 (BCIP/NBT 显色)

产品编号：D0007 规格：50T

应用范围

探针：Digoxin 标记的 mRNA 或 miRNA 探针

标本：石蜡组织切片、细胞爬片、血涂片

试剂盒组成

试剂	规格	数量	储存
Solution A	10ml	1	4℃
Solution B	10ml	1	4℃
RNA Hybridization Buffer	10ml	1	-20℃
Blocking Buffer	10ml	1	-20℃
Washing Buffer (10×)	100ml	2	4℃
Digoxin-AP Antibody	50μl	1	-20℃
BCIP/NBT	50μl	1	-20℃
BCIP/NBT 稀释液	6ml	1	4℃
核固红染液	5ml	1	RT
水溶性封片剂	5ml	1	4℃

注意：

- ① RNA Hybridization Buffer 低温储存时析出白色沉淀，使用前需在 37℃ 水浴至沉淀完全溶解。
- ② Washing Buffer (10×)，稀释前必须摇匀，摇匀后呈浑浊白色液态，且有少量泡沫；
- ③ 水溶性封片剂的有效成分为甘油和明胶（不含苯酚），在常温下呈固态，使用前必须在 65℃ 水浴至完全溶解后，才能使用，4℃ 储存时，有效期一年。水溶性封片的标本不能长期保存，建议封片后尽快拍照，若希望保存较长时间，可在封片后，可用液态石蜡封闭盖玻片四周。

需要自备的试剂、耗材与仪器

探针；二甲苯替代品； 100%、85%、70%乙醇；4%多聚甲醛；Rubber Cement；PBS (pH7.0) (0.1% DEPC 水配置)；盖玻片；染缸；镊子；0.2ml 离心管；湿盒；恒温箱；水浴锅；荧光显微镜

实验步骤

Day 1

1. 预处理

- 石蜡组织切片

二甲苯脱蜡，5min/次，3次；无水乙醇、85%乙醇、70%乙醇依次 5min；浸入 PBS，5min/次，1次

- 细胞爬片

浸入 PBS，5min/次，1次

- 血涂片

浸入 PBS，5min/次，1次

2. 将 Solution A 滴加在标本上，室温静置 20min；

3. 吸去 Solution A，滴加 Solution B，室温静置 15min；

4. 吸去 Solution B，在 PBS 溶液中浸泡 5min；

5. 甩去残留在片子上的 PBS，在标本上滴加 4%多聚甲醛，室温孵育 15min；

6. 吸去 4%多聚甲醛，在 PBS 溶液中浸泡 5min，洗涤后甩去残留 PBS；

7. 预杂交：在标本上滴加 100-200 μ l Hybridization Buffer，置于湿盒中，恒温箱 55℃，2hour；

8. 预杂交快结束时，准备探针：探针与 Hybridization Buffer 按 1:50~100 稀释，混合均匀后，85℃变性 3min，37℃平衡 2min；

9. 杂交：预杂交结束后，吸去 Hybridization Buffer，滴加 10 μ l 平衡后的探针，盖上盖玻片，用 Rubber Cement 封片，37~42℃杂交 16-72hours；

Day 2

10. 洗涤：Washing Buffer（10 $\times$ ）与蒸馏水按 1:9 混合均匀，配成工作液，揭去 Rubber Cement，将玻片放入 Washing Buffer 工作液，3-5min 后，盖玻片自动脱落，再将玻片移至新的 Washing Buffer 工作液（预热至 42℃），洗涤 2min，再移到室温的 Washing Buffer 工作液，洗涤 8min；

11. 吸去残留的 Washing Buffer，在标本上滴加 Blocking Buffer，可不加盖玻片，但要保证标本不会变干，放入湿盒中，37℃孵育 1hour；

12. 吸去残留的 Blocking Buffer，将 Digoxin-AP Antibody 与 Blocking Buffer 按 1: 50~100 稀释，稀释后加 20~50 μ l 在标本上，加盖玻片，放入湿盒，37℃孵育 1hour；

13. 将玻片浸入 PBS 中，待盖玻片自动脱落后，移至新的 PBS，洗涤 5min/次，2次，吸去残留 PBS；

14. BCIP/NBT 与 BCIP/NBT 稀释液按 1: 50~100 稀释, 适量 (以完全覆盖标本为准) 滴加在标本上, 37℃ 孵育 5~30min;
15. 洗去 BCIP/NBT 显色液, PBS 洗涤 2min;
16. 在标本上滴加快红染液, 染色 5~15min, 流水冲去染液, PBS 洗涤 5min, 晾干;
17. 水溶性封胶封片。

注意事项：

- 1) 注意戴手套;
- 2) 冬季室温温度较低, 可适当延长时间;
- 3) BCIP/NBT 显色不明显可以过夜, 最长不超过 18 小时。

广州市外显子生物技术有限公司

广州市海珠区敦和路 189 号留学人员创业基地 1 栋 308 室

技术支持: QQ 2251645850 订购: QQ 1050304988

咨询: E-mail: focobio@126.com; exonlab@qq.com; Tel: 86-020-89895006