

C 型原位杂交检测试剂盒 (BCIP/NBT 显色)

产品编号: D-0006 规格: 50 T

应用范围

探针: Biotin 标记的 mRNA、miRNA 探针

标本: 石蜡组织切片、细胞爬片、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℃
mRNA/miRNA Hybridization Buffer	10ml	1	-20℃
Blocking Buffer	10ml	1	4℃
Washing Buffer (10×)	100ml	2	RT
Adivin-AP	50μl	1	4℃
BCIP/NBT 显色液 (50×)	50μl	1	-20℃
BCIP/NBT 稀释液	6ml	1	4℃
核固红染液	3ml	1	RT
水溶性封片剂	5ml	1	4℃

需要自备的试剂、耗材与仪器

探针; 二甲苯或替代品; 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

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, 2 次

● 细胞爬片

浸入 PBS, 5min/次, 2 次

● 涂片

固定后, 浸入 PBS, 5min/次, 2 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, 2 次, 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 $^{\circ}$ C, 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 $^{\circ}$ C 变性 3min, 37 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C 杂交 16-72hours;
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, 盖玻片会自动脱落, 再将玻片移至新的 Washing Buffer 工作液 (预热至 42 $^{\circ}$ C), 洗涤 2min, 再移到室温的 Washing Buffer 工作液, 洗涤 8min; 再后 PBS 洗涤 3min, 2 次;
11. 在标本上滴加 Blocking Buffer, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。吸去 Blocking Buffer, 不用洗涤;
12. 将 Avidin-AP 和 Blocking Buffer 按 1: 100 稀释, 滴 1-3 滴在标本上, 加盖玻片, 放置在湿盒中, 37 $^{\circ}$ C 孵育 60-90min, PBS 洗涤 5min, 3 次;
13. 吸去残留的 PBS, 将 BCIP/NBT 用 BCIP/NBT 稀释液按 1: 50 混合, 滴加在标本上, 室温显色。
(可放到 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中, 加快显色反应, 但要间隔一段时间就观察显色情况, 如果显色过于缓慢, 可室温过夜显色)。
13. 流水洗去显色液中止显色, 放入 PBS 中洗涤 5min, 甩去 PBS;
14. 滴加核固红染液, 染色 3~5min, 流水洗去染色液, 晾干;
15. 水溶性封片液封片。(水溶性封片不能永久保存, 建议尽快拍照保存。若需保存较长时间, 可存放于 4 $^{\circ}$ C)。

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) 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