



PPT

(precision pathology technique)

广州市粤斌医学研究有限公司

原味杂交实验报告

广州市粤斌医学研究有限公司

电话:020-8478 4010

地址:广州市番禺区南村镇兴业大道 28 号华鑫大厦 1 栋 5 楼空中花园 502 室



一、实验对象

标本切片

二、实验器材及试剂

1、实验器材

名称	厂家	型号
脱水机	上海徠卡仪器有限公司	JJ-12J
包埋机	上海徠卡仪器有限公司	JB-P5
病理切片机	上海徠卡仪器有限公司	RM2016
冻台	上海徠卡仪器有限公司	JB-L5
组织摊片机	浙江省金华市科迪仪器设备有限公司	KD-P
烤箱	上海慧泰仪器制造有限公司	DHG-9140A
载玻片及盖玻片	江苏世泰实验器材有限公司	10212432C
正置光学显微镜	日本尼康	NIKON ECLIPSE CI
成像系统	日本尼康	NIKON DS-U3

2、主要实验试剂

试剂	厂家	货号
无水乙醇	天津市大贸化学试剂厂	
二甲苯	天津市大贸化学试剂厂	
苏木素-伊红染液	南京森贝伽生物科技有限公司	SBJ-0446
中性树胶	北京索莱宝科技有限公司	
一抗		
二抗		

三、原位杂交实验步骤

1. 烤片

2. 脱蜡

在通风橱中进行以下操作：

- 将各 200 毫升二甲苯分别倒入两洗液缸中。
- 将带有玻片的玻片架放入，不时上下晃动来回洗涤，共 5 分钟。
- 立刻移入另一盛有 200 毫升新的二甲苯的洗液缸，再不时上下晃动来回洗涤 5 分钟。
- 马上用 200 毫升 100%乙醇进行 1 分钟洗涤，重复两次。
- 用手尽量甩干玻片面上的酒精，将玻片放在晾片板或纸巾上，正面朝上，完全风干。

3. 组织预处理

请用加热器开始加热盛有 500 毫升 1X 预处理液 Bplus 的烧杯(请在高温加热器上直接加热，勿用水浴蒸煮)(参见视频)。

A. 将玻片放在注水后的湿盒中，依组织面积大小滴加 6-8 滴(300-400ul) 预处理液 A 完全覆盖组织，盖上盖子室温放置 10-30 分钟(通常 10 分钟)(参见视频)。

广州市粤斌医学研究有限公司

电话:020-8478 4010

地址:广州市番禺区南村镇兴业大道 28 号华鑫大厦 1 栋 5 楼空中花园 502 室



B. 手持玻片甩掉玻片上的液体，用 200ml 超纯水在洗缸中震荡洗涤约 30-60 秒。换水共洗涤三次。

C. 确认预处理液 1XBplus 已经加热至温度为 95-100℃。需使用温度计插入液面下准确测量，肉眼可见沸腾持续有大泡冒出即可，请勿沸腾太久(超过 10 分钟)以免液体蒸发太多(参见视频)。

D. 将载有玻片的玻片架浸入沸腾的预处理液 1XBplus 中，煮的时间请按照附录建议的方法来确定最佳时间(通常为 15 分钟)。

E. 立即取出玻片架浸入含有 200 毫升的超纯水的洗液缸中上下搅动清洗 1 分钟，换新水重复步骤共三次洗涤。

F. 将玻片移入装有 200ml 100%乙醇的洗缸中上下晃动十次，然后静置 3 分钟。将玻片从乙醇中取出，手持尽量甩去玻片上的乙醇，面朝上放置在室温下待玻片自然风干。

4. 画疏水圈

请只使用我们建议的疏水笔类型, 其它免疫组化疏水笔会导致杂交过程中疏水圈脱落。

A. 将疏水笔笔尖在吸水纸上轻触几下，让疏水液流畅地缓慢渗出。

B. 在组织周围画一圈蓝色的疏水圈, 风干 5-20 分钟左右至完全干透(疏水圈内面积最小不能小于 15mmX15mm)。

5. 消化酶消化

请务必在恒温箱中预热 1X 消化酶 II 工作液至 40℃(每片约需 200-400ul, 视切片面积而定)

A. 将原位杂交仪设置为实际杂交温度 40℃, 并确认盖子内面插入两条已水饱和的保湿条!(参见视频)从此步骤开始保持杂交仪始终处于 40℃杂交状态。

B. 将所有玻片摆放在原位杂交仪的杂交面板上。依次加 200-400ul 消化液, 必须完全覆盖组织(某些类型玻片或组织因表面张力不易完全覆盖, 可用移液器的移液头协助, 或参照视频指导有技巧地使用滴液头在滴液的同时使液滴覆盖住组织)。盖上盖子, 并开始计时。最优的消化时间请按照附录里的办法来确定。(通常为 15 分钟)

C. 在洗缸中注入 200ml 超纯水并放入一玻片架。消化结束后, 将玻片依次取出, 甩掉消化液, 放入玻片架中, 在 200ml 超纯水中上下洗涤 1 分钟。

D. 重复步骤 C 两次共三次洗涤。

*孵育结束时请按顺序依次按时取出玻片, 保证每一张玻片的消化时间都为最优时间。

*从此步骤开始绝不可以让玻片干燥, 应及时滴加反应液保持湿润

6. 探针杂交

所有阳性, 阴性/空白探针使用前需在 40℃恒温箱中预热至少 6 分钟左右, 并上下颠倒混匀至肉眼观察无沉淀

A. (参见视频)逐一将玻片取出, 尽量甩掉正面残存的水, 背面用吸水纸擦干, 将玻片放在孵育板上快速在疏水圈范围内滴入 8-12 滴(约 200-300ul)预热的探针杂交液覆盖整片组织。(尽快操作请勿让组织干燥)。然后处理下一张玻片。

B. 盖上孵育器盖子, 在 40℃杂交 2 小时。

7. 洗涤玻片

A. 将空玻片架放入盛有 200ml 1x 洗液的洗片缸中。

B. 逐一将玻片从孵育器取出, 甩掉探针杂交液, 将玻片放入玻片架。

C. 手提玻片架上下持续洗涤玻片 90-120 秒。或者使用水平震荡仪震荡洗涤 2 分钟(200rpm)。



D. 换新的 1x 洗液，共进行两次各两分钟的洗涤。

8. 反应 1

请确认反应 1 已在 40℃ 恒温箱中预热至少 6 分钟左右，并上下颠倒混匀至肉眼观察无沉淀

A. 逐一将玻片取出，甩掉正面残存的洗液，背面用吸水纸擦干，将玻片放在孵育器面板上后立即在疏水圈范围内滴入 6-8 滴 (约 150-200ul) 预热的反应液 1 覆盖整片组织。然后接着处理下一张玻片直至全部滴加完成。

B. 盖上盖子，在 40℃ 杂交 25 分钟。

C. 将空玻片架放入盛有 200ml 1X 洗液的洗片缸中。

D. 逐一按顺序将玻片从孵育器取出，甩掉反应液 1，将玻片放入玻片架 (注意各片间隔时间以保证杂交时间一致)。

E. 手提玻片架上下持续洗涤玻片 90-120 秒。或者使用水平震荡仪震荡洗涤 2 分钟 (200rpm)。换新的 1X 洗液，共进行两次各两分钟的洗涤。

9. 反应 2

请确认反应 2 已在 40℃ 恒温箱中预热至少 6 分钟左右，并上下颠倒混匀至肉眼观察无沉淀

A. 逐一将玻片取出，甩掉正面残存的洗液，背面用吸水纸擦干，将玻片放在孵育器面板上后立即在疏水圈范围内滴入 6-8 滴 (约 150-200ul) 预热的反应液 2 覆盖整片组织。然后接着处理下一张玻片直至全部滴加完成。

B. 盖上盖子，在 40℃ 杂交 15 分钟。

C. 将空玻片架放入盛有 200ml 1x 洗液的洗片缸中。

D. 逐一按顺序将玻片从孵育器取出，甩掉反应液 2，将玻片放入玻片架 (注意各片间隔时间以保证杂交时间一致)。

E. 手提玻片架上下持续洗涤玻片 90-120 秒。或者使用水平震荡仪震荡洗涤 2 分钟 (200rpm)。换新的 1x 洗液，共进行两次各两分钟的洗涤。

10. 反应 3

请确认反应 3 已在 40℃ 恒温箱中预热至少 6 分钟左右，并上下颠倒混匀至肉眼观察无沉淀

A. 逐一将玻片取出，甩掉正面残存的洗液，背面用吸水纸擦干，将玻片放在孵育器面板上后立即在疏水圈范围内滴入 6-8 滴 (约 150-200ul) 预热的反应液 3 覆盖整片组织。然后接着处理下一张玻片直至全部滴加完成。

B. 盖上盖子，在 40℃ 杂交 15 分钟。

C. 将空玻片架放入盛有 200ml 1X 洗液的洗片缸中。

D. 逐一按顺序将玻片从孵育器取出，甩掉反应液 3，将玻片放入玻片架 (注意各片间隔时间以保证杂交时间一致)。

E. 手提玻片架上下持续洗涤玻片 90-120 秒。或者使用水平震荡仪震荡洗涤 2 分钟 (200rpm)。换新的 1x 洗液，共进行两次各两分钟的洗涤。

11. 反应 4

请确认反应 4 已经回复室温。

A. 逐一将玻片取出，甩掉正面残存的洗液，背面用吸水纸擦干，将玻片放在湿盒内，立即在疏水圈范围内滴入 2-4 滴 (约 80-160ul) 反应液 4 覆盖整片组织。然后接着处理下一张玻片直至全部滴加完成。



B. 避光室温反应 5-10 分钟(此时间可调整以增强或减弱信号)。请确保每一张片子的反应时间保持一致,以保证结果的可比性。

C. 将空玻片架放入盛有 200ml 1x 洗液的洗片缸中。

D. 逐一按顺序将玻片从湿盒取出,甩掉反应液 4,将玻片放入玻片架(注意-各片间隔时间以保证杂交时间一致)。

E. 手提玻片架上下持续洗涤玻片 90-120 秒。或者使用水平震荡仪震荡洗涤 2 分钟(200rpm)。换新的 1X 洗液,共进行两次各两分钟的洗涤。

12. 反应 5

请确认反应 5 已经回复室温。

A. 逐一将玻片取出,甩掉正面残存的洗液,背面用吸水纸擦干,将玻片放在湿盒内,立即在疏水圈范围内滴入 2-4 滴(约 80-160ul)反应液 5 覆盖整片组织。然后接着处理下一张玻片直至全部滴加完成。

B. 避光室温反应 15 分钟。

C. 将空玻片架放入盛有 200ml 1X 洗液的洗片缸中。

D. 逐一按顺序将玻片从湿盒取出,甩掉反应液 5,将玻片放入玻片架(注意各片间隔时间以保证杂交时间一致)。

E. 手提玻片架上下持续洗涤玻片 90-120 秒。或者使用水平震荡仪震荡洗涤 2 分钟(200rpm)。换新的 1X 洗液,共进行两次各两分钟的洗涤。

13. 显色反应

请确认底物稀释液已经回复室温。

A. 新鲜配制底物:在试管中加入 1mL 常温的底物稀释液(足够 6 张玻片),加入 16 微升底物 1,混匀,再加入 16 微升底物 2,混匀,该底物必须在 10 分钟内使用。

B. 尽量甩掉玻片上的残留洗液,在疏水圈内加入 100-150uL 新鲜配制的底物。常温在湿盒内避光孵育 5 分钟。

C. 将空玻片架放入盛有 200ml 纯水的洗片缸中。

D. 逐一按顺序将玻片从湿盒取出,甩掉底物,将玻片放入玻片架(注意各片间隔时间以保证杂交时间一致)。

E. 手提玻片架上下持续洗涤玻片 90-120 秒。或者使用水平震荡仪震荡洗涤 2 分钟(200rpm)。换新的纯水,共进行两次各两分钟的洗涤。

14. 核染并封片

A. 将玻片转移到含有 200ml 苏木精的染缸中染色 5-30 秒(依所使用的苏木精浓度而定)。或者在玻片上疏水圈范围内加 400 微升苏木精染色液。

B. 用新的 200ml 纯水洗一分钟,重复三次,去除多余苏木精。

C. 在 200ml 0.02%的氨水中浸泡 5 秒钟。

D. 用新的 200ml 纯水洗一分钟,共两次。

E. 如果打算使用荧光显微镜查看实验结果,可以将玻片浸泡在 200 毫升 DAPI 染色溶液中 1 分钟,而后用 200 毫升新鲜 ddH₂O 冲洗 1 分钟。

F. 从玻片架中取出玻片,然后轻轻地甩掉表面多余的液体,用吸水纸擦拭玻片背面。将玻片放在空气中风干,确保在封装前完全干燥(约 20 分钟)。



PPT

(precision pathology technique)

G. 用推荐的封片剂(水性或非水性封片剂均可)和盖玻片直接封片。也可使用酒精脱水,二甲苯浸泡后封片。

广州市粤斌医学研究有限公司

广州市粤斌医学研究有限公司

电话:020-8478 4010

地址:广州市番禺区南村镇兴业大道 28 号华鑫大厦 1 栋 5 楼空中花园 502 室