

原位PCR和原位RT-PCR操作规程

一、仪器设备

英国Thermo Hybaid原位PCR仪。

二、操作流程

1、原位PCR步骤

1) 预处理：

- (1) 切片常规脱蜡；
- (2) 0.2mol/L HCl处理 10min；
- (3) 5 μ g/ml蛋白酶K消化组织 37°C 10min；
- (4) Nase消化组织 37°C 30min；
- (5) 梯度酒精脱水，室温干燥。

2) 原位扩增：

- (1) 切片滴加特异性序列引物 30 μ L PCR扩增反应液，覆盖硅化盖玻片，石蜡油封边；
- (2) PCR热循环：94°C，1min；55°C，1min；72°C，1.5min，共 25~30 个循环，72°C 延伸 10min；
- (3) 氯仿洗去盖玻片，4%多聚甲醛后固定 10min，梯度酒精脱水，干燥。

3) 原位杂交：

- (1) 加地高辛标记探针的杂交液，98°C变性 10min，-20°C退火 5min，42°C杂交过夜。
- (2) 杂交后用 2 \times SSC洗涤 10min，3 次，1 \times SSC洗涤 10min，3 次；
- (3) 缓冲液洗涤 10min，3 次；
- (4) 加碱性磷酸酶标记的羊抗地高辛抗体复合物，37°C，2h；
- (5) 缓冲液洗涤 5min，3 次；
- (6) NBT、BCIP暗处显色，镜下控制，终止显色。
- (7) 常规脱水：透明、封固。

2、原位RT-PCR步骤

1) 预处理：

- (1) 蛋白酶K(0.3mg/mL) 54°C消化 20min，蒸馏水洗；
- (2) 95°C加热 3min，灭活残存的蛋白酶。

2) 原位扩增：

- (1) 在有RNA酶抑制剂存在的条件下，用随机六聚物进行逆转录反应；
- (2) 用热启动法进行PCR扩增。标本加热至 75℃时加上反应液，覆以盖玻片，四周用指甲油密封。然后将温度升至 95℃，2min。再将热循环仪设定为 95℃，45s，55℃，1min和 75℃，45s，共 26 次循环；
- (3) 扩增结束后，在 80℃烤 15min~30min。

3) 原位杂交：

- (1) 杂交前标本 95℃加热 3min；
- (2) 加上杂交液，湿盒内 50℃过夜；杂交液组成：25%硫酸葡聚糖，2×SSC，50%甲酰胺，0.33mg/ml变性的鲑鱼精子DNA，每 0.5mL杂交液内含生物素标记探针 1ng。
- (3) 扩增的 β -肌动蛋白和IL-6用DAKO检测试剂盒K600(链霉卵白素，生物素标记的碱性磷酸酶和硝基四氮唑蓝)检测。阳性反应呈紫色。



上海闪晶分子生物科技有限公司

地址：上海市闵行区北桥镇吴河路328号A栋2楼

邮编：201109

联系：市场部

电话：54460832 800-988-1995

E-mail:master@shinegene.org.cn

网址：www.shinegene.org.cn

