

原位杂交 (In Situ Hybridization) 产品专题

研究背景

定义: 原位杂交 (in situ hybridization) 属于分子杂交的一种, 是一种将标记探针直接于组织或细胞中的待测核酸杂交, 并结合免疫细胞化学的原理使用合适的检测系统, 从而对目标核酸序列进行精确定量定位的方法。

发展进程: 1969 年 Pardue 和 Gall 最先研发了此项技术, 当时可用的唯一标记物是放射性同位素, 放射自显影技术显然成为探针序列检测的方法。但放射性标记探针由于安全要求措施严格、有效期短、显影时间长及放射衰变引发的低分辨率等因素, 原位杂交技术的发展和應用大受限制。直至非放射性标记探针的出现, 彻底排除原位杂交中遇到的种种阻碍, 使得该技术得到广泛应用。

方法: 非放射性原位杂交技术根据标记探针的类型分为两种。直接检测法 (以荧光素直接标记探针) 和间接检测法 (以地高辛或生物素标记的核苷酸作为底物, 通过 PCR 合成标记探针。)

产品分类

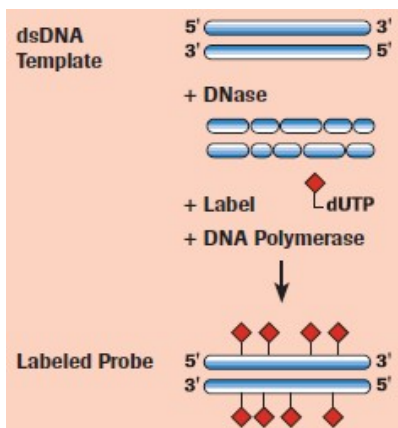
Roche 提供的原位杂交产品根据实验的大致流程主要集中在以下三个部分:

- (1) 标记探针的制备;
- (2) 标记探针的纯化与杂交;
- (3) 靶序列与标记探针复合物的检测;

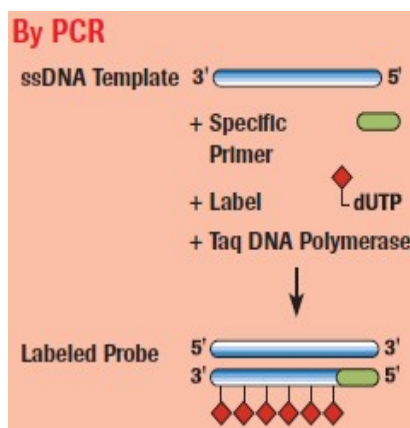
产品列表 1.1 — — DNA 探针的标记

DNA 探针的标记方法 常用的有 PCR 法、随机引物法和缺口平移法, 原位杂交实验主要用缺口平移法, 此方法易得到高比活性、均匀、特异性高的探针, 且易控制探针长度 (对原位杂交非常重要)。也可以用 PCR 扩增法, 此方法最大的特点在能对量少且纯度不高的模板进行高效标记。

缺口平移法探针标记实验大致流程:



PCR 扩增法探针标记实验大致流程:



缺口平移法与 PCR 法的工作原理:

缺口平移法的原理: 利用 DNA 聚合酶 I 在 DNA 探针分子的一条链上打开缺口(nick), 缺口处形成 3'-OH 末端, 之后利用 DNA 聚合酶 I 的 5'→3' 方向外切酶活性, 将缺口处 5' 端核苷酸依次切除; 同时在 DNA 聚合酶 I 的 5'→3' 聚合酶活性的催化下, 以另一条 DNA 链为模板, 以 dNTP (含标记核苷酸) 为原料, 依次将 dNTP 连接到切口的 3' 羟基上, 从 5' 端向 3' 端方向重新合成一条带标记的互补链, 即标记的 DNA 探针。

PCR 扩增法的原理: 在 Taq DNA 聚合酶的作用下, 以变性后的单链 DNA 为模板, 含标记核苷酸的 dNTP mixture 为原料, 在特异性引物的引导下扩增合成一定量的标记探针。

产品名称	货号	规格	报价(¥)	说明
Nick Translation Kit	10976776001	50 tests	3051	缺口平移法, 只需提供放射性或非放射性标记的 dNTP 即可。
DIG-Nick Translation Mix	11745816910	160 µl, 40 reactions	5967	缺口平移法完成 DIG 探针标记;
Biotin-Nick Translation Mix	11745824910	160 µl, 40 reactions	4828	缺口平移法完成生物素探针标记。

PCR DIG Probe Synthesis Kit	11636090910	25 reactions	6172	PCR 法完成 DIG 探针标记;
PCR DIG Labeling Mix	11585550910	500 μ l (50 次标记反应)	5311	用来监测 PCR 扩增反应, 并非 PCR DIG 标记试剂盒内标记混合物的直接替代产品。
PCR DIG Labeling Mix ^{PLUS}	11835289910	500 μ l (100 次标记反应)	5210	直接标记 PCR 扩增产物, 可以预防交叉污染。与 PCR DIG Labeling Mix 具相同的标记效率;
PCR Fluorescein Labeling Mix	11636154910	10 reactions	3873	PCR 法完成荧光素探针标记, 特别适用于 FISH (荧光原位杂交);
Digoxigenin-11-dUTP, alkali-stable	11093088910	25 nmol (25 μ l)	3682	DIG 标记底物, 碱变性稳定性, 可用于多种标记方法。
Digoxigenin-11-dUTP, alkali-labile	11573152910	25 nmol	3682	DIG 标记底物, 碱变性不稳定性, 可用于多种标记方法。易于探针剥离。
Biotin-16-dUTP	11093070910	50 nmol (50 μ l)	3464	生物素标记底物, 可用于多种标记方法。
Fluorescein-12-dUTP	11373242910	25 nmol (25 μ l)	3425	荧光素标记底物, 可用于多种标记方法。
DNA Polymerase I, endonuclease-free	10642711001	250 U	1344	适用于缺口平移标记 DNA 和 cDNA 第二链合成实验。
DNase I recombinant, RNase-free	04716728001	10,000 U	2404	制备 DNA-free 的 RNA 和蛋白。
Expand High Fidelity ^{PLUS} PCR System	03300242001	125 U	1025	高效扩增 \leq 5 kb DNA, 6 \times 保真度高于常规 Taq DNA 聚合酶, 另外可预防交叉污染。

产品列表 1.2 — — RNA 探针的标记

RNA 探针标记方法——体外转录法, 在 T3/T7/SP6 RNA 聚合酶作用下体外完成标记探针的合成。

产品名称	货号	规格	报价(¥)	说明
DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7)	11175025910	2 \times 10 reactions	8370	体外转录合成 DIG 标记的 RNA 探针; 1 μ g 质粒模板合成至少 10 μ g 标记 RNA 探针;
DIG RNA Labeling Mix	11277073910	40 μ l, 20 reactions	2044	含 DIG-11-UTP, 可同时用于 T3/T7/SP6 酶催化下的标记反应;
Biotin RNA Labeling Mix	11685597910	40 μ l, 20 reactions	1748	含 Biotin-16-UTP, 可同时用于 T3/T7/SP6 酶催化下的标记反应;
Fluorescein RNA Labeling Mix	11427857910	40 μ l, 20 reactions	2317	含 Fluorescein-12-UTP, 可同时用于 T3/T7/SP6 酶催化下的标记反应;
Digoxigenin-11-UTP	11209256910	250 nmol (25 μ l)	3184	T3/T7/SP6 聚合酶反应的底物;
Biotin-16-UTP	11388908910	250 nmol (25 μ l)	2277	T3/T7/SP6 聚合酶反应的底物;
Fluorescein-12-UTP	11427857910	250 nmol (25 μ l)	2317	T3/T7/SP6 聚合酶反应的底物;
SP6 RNA Polymerase	10810274001	1,000 U	3758	RNA 体外转录酶;
T3 RNA Polymerase	11031163001	1,000 U	1168	RNA 体外转录酶;
T7 RNA Polymerase	10881767001	1,000 U	1226	RNA 体外转录酶;
Protector RNase Inhibitor	03335399001	2,000 U	1090	抑制 RNA 降解;

产品列表 1.3 — — 寡核苷酸探针的标记

寡核苷酸探针标记方法常用的为尾部嵌入法 (tailing), 3'-末端标记法和 5'-末端标记法. 3'-末端标记法标记的探针适合于原位杂交实验, 因为探针小易扩散到固定好的组织或细胞内。

实验流程	产品名称	货号	规格	报价(¥)
------	------	----	----	-------

<p>Oligonucleotide 5' ————— 3'</p> <p>Label + Terminal Transferase</p> <p>ddUTP</p> <p>Labeled Probe 5' ————— 3'</p>	DIG Oligonucleotide 3'-End Labeling Kit, 2nd generation	03353575910	25 reactions	8194
	Digoxigenin-11-ddUTP	11363905910	25 nmol (25µl)	2438
	Biotin-16-ddUTP	11427598910	25 nmol (25µl)	5506
	Terminal Transferase	03333566001	8,000 U	1090

产品列表 2 —— 标记探针的纯化与杂交

标记探针的纯化				
产品名称	货号	规格	报价(¥)	说明
High Pure PCR Product Purification Kit	11732668001	50 次	572	≤20 min 快速回收纯化大于 100bpDNA, 回收率 ≥90%, 去除引物或引物二聚体。
High Pure PCR Cleanup Micro Kit	04983955001	50 次	2370	≤10 min 快速回收纯化 DNA, 可去除 ≤70bp 的 DNA, 回收率 ≥80%。

核酸探针的杂交:

杂交是整个实验中非常重要的一部分, 杂交受很多因素的影响, 如 pH、温度、一价阳离子、有机溶剂等。

大片段DNA探针 (≥100 bp) 杂交液:

- 50% deionized formamide ; 2× SSC ; 50 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ buffer; pH 7.0

- 1 mM EDTA ; carrier DNA/RNA (1 mg/ml each) ; probe (approx. 20–200 ng/ml)

Optional components:

- 1× Denhardt's (see below); dextran sulfate, 5–10%; Temperature: 37°–42°C

- Hybridization time: 5 min–16 h

20 ×SSC stock solution:

(3 M NaCl, 0.3 M sodium citrate)

50× Denhardt's:

1% polyvinylchloride, 1% pyrrolidone,

2% BSA

产品名称	货号	规格	报价(¥)	说明
Buffers in a Box, Premixed SSC Buffer, 20x	11666681001	4 L	2729	配制预杂交和杂交缓冲液, 或清洗;
Hybridization Bags	11666649001	50 bags	1315	用于非放射性杂交和检测; 标准放射性杂交; WB;
Blocking Reagent	11096176001	50 g	1364	用于地高辛标记探针的封闭, 减少非特异性结合位点;
BSA, 第五组分	BAH62-0025	25g	576	生物素标记探针的封闭液成分之一;
Tween 20	11332465001	5 x 10 ml	1001	生物素标记探针的封闭液成分之一;

产品列表 3 —— 免疫细胞化学法检测系统

ISH-AP 检测系统				
产品类型	名称	货号	报价(¥)	说明
标记抗体	Streptavidin-AP, for biotin	11093266910 (150 U)	2317	
标记抗体	Anti-Fluorescein-AP, Fab fragments	11426338910 (150 U)	2394	
标记抗体	Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments	11093274910 (150 U)	2821	
显色试剂	NBT/BCIP Stock Solution	11681451001 (8 ml)	1364	
显色试剂	NBT/BCIP Ready-to-Use Tablets	11697471001 (20 tablets)	1462	

ISH-POD 检测系统				
产品类型	名称	货号	报价(¥)	说明
标记抗体	Streptavidin-POD, for biotin	11089153001 (500 U)	2963	
标记抗体	Anti-Digoxigenin-POD, Fab fragments	11207733910 (150 U)	3019	
显色试剂	DAB Substrate, metal enhanced, precipitating	11718096001 - 1 pack	2140	
FISH-AP 检测系统				
产品类型	名称	货号	报价(¥)	说明
检测试剂盒	HNPP Fluorescent Detection Set	11758888001 - 1 set	4231	可用于原位及膜杂交荧光显色检测用，发射红色或桔色荧光。

我公司所售全部产品均为科研用途!

免费电话: 4006-111-883

上海翊圣生物科技有限公司	
公司地址:	上海市徐汇区南丹东路 18 号 12 楼 A 座
联系电话:	021-64689017 021-64689027
传真:	021-64689017-8008 021-64689027-8008
移动电话:	13918775203 (周末和紧急情况下联系)
北京分公司	
公司地址:	北京朝阳区大屯路 2 号南沙滩 35 号楼科华商务大厦 613 室
联系电话:	010-64847623 010-64855926
传真:	010-64847623-8008 010-64855926-8008
移动电话:	18910229156 (周末和紧急情况下联系)
南京办事处	
公司地址:	南京市鼓楼区中央路 323 号利奥大厦 1402 室 (和新模范马路路口交叉)
联系电话:	025-83535567
传真:	025-83535565
移动电话:	18061695143 (周末和紧急情况下联系)

