**原位杂交Protocol**

1. **样品处理**（One week）

配DEPC-H2O，8.5% NaCl（+DEPC）,2%曙红（醇溶），将要用的玻璃器皿（烧杯，量筒）180℃处理6h以上。

* 0.1%DEPC-H2O配制（通风橱中操作）：1L纯水中加入1mlDEPC，用锡箔纸包裹，搅拌器上剧烈搅拌10min左右，静置4h以上，高温高压灭菌（121℃，15min即可）。

**DEPC**（焦碳酸二乙酯）：一种强烈但不彻底的RNA酶抑制剂。可通过和RNA酶的活性基团组氨酸的咪唑环结合使蛋白质变性，从而抑制酶的活性。高温高压灭菌后分解成CO2和乙醇，失去毒性。DEPC在Tris、HEPES、DTT等溶液中极易分解，因此不能直接用DEPC来处理Tris等缓冲液。

* 3.7%FAA固定液(100ml，预冷)

50ml 无水乙醇

5ml 冰醋酸

10ml 37%甲醛

35ml DEPC-H2O

* 2%曙红（100ml）

2g曙红溶于100ml无水乙醇中，充分混匀。

* 梯度乙醇（100ml）

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 梯度乙醇 | 无水乙醇（ml） | 8.5% NaCl(ml) | DEPC-H2O(ml) |
| 50% | 50 | 10 | 40 |
| 70% | 70 | 10 | 20 |
| 85% | 85 | 10 | 5 |
| 95% | 95 | 0 | 5 |

（1）**取样（Day1,冰上）**。 将样品取下立即放入新鲜配制的3.7% FAA 固定液（ DEPC 水配制，预冷）中，抽真空 15 min，至样品沉底，换新固定液， 4℃振荡过夜。

将DEPC-H2O，8.5% NaCl（+DEPC）,2%曙红（醇溶），无水乙醇，配置梯度酒精的容器放于4℃预冷，60℃溶蜡。

（2） **脱水（Day2,4℃，摇床）**。 4℃振荡条件下，依次经过 50%（0.85% NaCl）， 70%（0.85% NaCl）， 85%（ 0.85% NaCl）， 95%， 100%乙醇溶液，每一步加几滴 2%曙红溶液每步1.5h，最后换新 100%无水乙醇，4℃振荡过夜。  
（3） **透明（Day3,室温，摇床）**。换新 100%无水乙醇置于室温振荡 2 h。换 50%乙醇/50%二甲苯，室温振荡 1 h。换3 次 100%二甲苯，每次室温振荡 1h。换新 100%二甲苯，加入 1/4 体积 Paraplast 蜡片，通风橱静置过夜。  
（4） **浸蜡（Day4，42℃→60℃）**。将样品置于 42℃至蜡片全部溶解， 倒掉二甲苯，倒入熔化的蜡， 60℃静置过夜。连续换新蜡 3 d，每天换两次。在第 4 d，换新蜡并将样品整齐摆入模具。  
（5） **切片、展片和烘片（一次可做60张片子，正义探针2-3张，反义探针3张以上）**。将包埋有样品的蜡块修成梯形小块，粘固在小木块上，装在切片机上，设定蜡片厚度为 8 μm，旋转手柄进行切片，将切下的连续蜡带小心平放在干净的 A4纸上，镜检。先在玻片上滴加 1 ml DEPC-H2O，将镜检后合适的蜡片漂浮在水，将载玻片平放在 42℃的烘片机上展片。 5 ～ 10 min 后蜡片完全展开，用吸水纸小心从载玻片一侧将水吸干，并用力将蜡片下少量的水甩出，或用针尖扎破水泡再用干的吸水纸将蜡带下的水滴吸干。 42℃烘片 2-3 d，不宜长时间烘片。可于4℃下暂时保存几个小时。

1. **探针制备**（One day）

配制4 M NH4Ac，2×碳酸盐缓冲液，10%冰醋酸，3M NaAc（pH5.2）, 70%乙醇，50%甲酰胺（均用1.5ml RNase-free 管分装，-20℃保存）

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **2×碳酸盐缓冲液(分装1ml/管，-20℃保存)** | | | |
|  | 工作液浓度 | 体积(20ml) |
| NaHCO3(84.01g/mol) | 80mM | 0.1344g |
| Na2CO3(106g/mol) | 120mM | 0.2544g |
| DEPC-H2O |  | 至20 ml |

* **10%冰醋酸**（10ml，1ml/管分装，-20℃保存）：1ml冰醋酸+9ml DEPC-H2O
* **4M NH4Ac**

称取3.084g醋酸铵，加入适量DEPC-H2O溶解，后定容至10ml。混匀，**抽滤灭菌**。

* **3M NaAc（pH5.2）**

2.5504g 无水NaOAc（82.03g/mol）溶于10ml DEPC-H2O中，用冰醋酸调pH至5.2。

* **70%乙醇**（用DEPC-H2O配制）
* **50%甲酰胺**（10ml，1ml/管分装，-20℃保存）：5ml DEPC-H2O + 5ml甲酰胺（Sigma）

1. **模板制备**。选择目标基因cDNA中特异区段，利用含有T7启动子序列的引物分别扩增正义探针（Mock，引物的正向带有T7启动子序列）和反义探针片段（引物的反向带有T7启动子序列）。产物大小 100 ～ 1000bp（一般300bp左右），以cDNA 或表达载体为模板利用高保真酶进行 PCR 扩增（扩20～30个孔，每孔20μl 体系）， PCR 产物进行纯化，加20μl用DEPC-H2O洗脱，用Nanodrop测定浓度，保存备用。

T7启动子序列：TAATACGACTCACTATAGGG

例

*SH4*(446bp)

正义 HSH4\_1F: TAATACGACTCACTATAGGGATCATCGGCCGGAGGAGTCG

HSH4\_1R:GCACCACCATCACGGCCATC

反义 HSH4\_2F:ATCATCGGCCGGAGGAGTCG

HSH4\_2R: TAATACGACTCACTATAGGGGCACCACCATCACGGCCATC

1. **体外转录**。20 μl 体系, 37℃保温 2 h。取1 μl电泳检测，以确定转录情况。

2 μl 10×Transcription buffer（Roche，T7酶自带），

2 μl 10×DIG-RNA labeling mix （Roche）

1 μl RRI（RNA 酶抑制剂，TaKaRa）

2 μl T7 RNA 聚合酶(Roche)

≥1 μg DNA模板（不足13 μl用RNase-free 水补，1μg可生成2μg RNA，理论上只有2μg RNA被标记。本Kit理论上可生成10μg RNA。）

1. **探针纯化**。
2. 向上述转录产物依次加入

75 μl RNase-free H2O

1 μl 100 mg/ml tRNA（Ruitaibio Yeast tRNA,用200μl DEPC-H2O溶解，-20℃保存）

1 μl RNase-free DNaseⅠ(5 U/μl ，TaKaRa)

37℃保温 **30** min,去除DNA。

2）**沉淀**。加入

95 μl 预冷的4 M NH4Ac（等体积）

190 μl预冷的无水乙醇（2 Vol），轻轻颠倒混匀，置于-20℃ 1～2 h；

4℃ 14000 rpm 离心 10 min弃上清；

沉淀用600 μl 70%乙醇漂洗，4℃ 14000 rpm 离心 7 min，弃上清。于超净台中，置于冰上吹干1h。

3)**水解（Hydrolysis）**。加入100μl RNase-free 水重悬沉淀，再加入 100 μl 2×碳酸盐缓冲液， 60℃保温适当时间。

所需时间 t=（初始片段长度-终长度） /（ k×初始片段长度×终长度）； k= 0.11 kb/min；最适终长度为 150bp。

即

t=（初始片段长度-150）×1000 /（0.11×初始片段长度×150）min

4）**中和**。依次加入

10 μl 10%冰醋酸

21 μl 3 M NaAc（pH 5.2，1/10 Vol）

420 μl无水乙醇（2 Vol）。

后置于-20℃ 3 h以上，4℃ 14000 rpm 离心 10 min弃上清，沉淀用600 μl 70%乙醇漂洗，4℃ 14000 rpm 离心 7 min，弃上清。于超净台中，置于冰上吹干1h。

加入**40μl** 50%甲酰胺（Sigma，用DEPC-H2O配制，-20℃保存）溶解沉淀，于-80℃长期保存探针。

若探针长500bp，一张片子需25ng探针。

根据序列长度计算探针工作浓度：

一张载玻片所需探针量（ ng） =0.5 ng×杂交液体积（μl）×探针长度（ kb）。

（4） **探针质量检测**。琼脂糖凝胶电泳。

**三、杂交前的预处理**（Half of one day）

准备工作：

（提前配好相关母液，除含Tris的溶液外，其他均在配好后用DEPC处理4h以上再灭菌，Tris相关母液用DEPC-H2O配制后灭菌）

预处理前一天：16个大染色缸、各种规格量筒、约10个1L的空瓶（180℃，6h以上）、15L左右DEPC-H2O

预处理当天（8：00-12:00）：用DEPC-H2O配制梯度乙醇各1L，1×PBS 4L，0.85% NaCl 1L，乙酸酐溶液500ml。 Protein K溶液 500ml（**37℃提前预热**）, 0.2%甘氨酸溶液、4%甲醛溶液各500ml。

**相关母液配制**

**10×PBS（灭菌）**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 组分 | 工作液浓度 | 10× |
| NaCl | 130mM | 75.97 g |
| Na2HPO4（141.96g/mol） | 7mM | 9.9372g |
| NaH2PO4（119.18g/mol） | 3mM | 4.68 g |
| 纯水 |  | 至1L |
| DEPC |  | 1 ml |
| 充分混匀后通风橱中静置一夜，**灭菌** | | |

1×PBS用DEPC-H2O稀释10倍即可。

**1M Tris-HCl（pH7.5 8.0 9.5 灭菌）**

|  |  |
| --- | --- |
| Tris(121.14g/mol) | 121.14 g |
| DEPC-H2O | 约800 ml |
| 浓盐酸 | 约60 ml(pH7.5)  约42 ml(pH8.0)  约2 ml(pH9.5) |
|  | 定容至1L |

注：pH7.5配2L（其中1L用来配10×TBS），8.0和9.5各1L。

**0.5M EDTA（pH8.0 灭菌）** 注：pH8.0左右才会完全溶解

|  |  |
| --- | --- |
| EDTA二钠盐（372.24g/mol） | 186.1 g |
| DEPC-H2O | 约800 ml |
| NaOH | 约20 g |
|  | 定容至1L |

**相关试剂配制（现配现用）**

**Protein K溶液**（500ml,提前一晚37℃预热，**用时再加蛋白酶K**）

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | 工作液浓度 | Stock | 体积 |
| Tris(pH8.0) | 100mM | 1M | 50 ml |
| EDTA | 50mM | 0.5M | 50 ml |
| DEPC-H2O |  |  | 400 ml |
| proteinase K （sigma DEPC-H2O配制分装，-20℃保存） | 1μg /ml | 10mg/ml | 50μl |

**梯度乙醇(1L)**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 梯度 | 无水乙醇（ml） | 8.5% NaCl(ml) | DEPC-H2O(ml) |
| 95% | 950 | 0 | 50 |
| 85% | 850 | 100 | 50 |
| 70% | 700 | 100 | 200 |
| 50% | 500 | 100 | 400 |
| 30% | 300 | 100 | 600 |
| 0.85% Nacl | 0 | 100 | 900 |

**0.2%甘氨酸溶液**（抑制Protein K 活性）

1g甘氨酸溶于500ml 1×PBS溶液中。

**4%甲醛溶液（500ml）**

|  |  |
| --- | --- |
| 37%甲醛(Sigma) | 54 ml |
| 10×PBS | 50 ml |
| DEPC-H2O | 396 ml |

**乙酸酐溶液(500ml)** ——乙酰化处理，可降低背景信号

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 三乙醇胺（用剪过的枪头吸） | 6.62 ml |  | | |
| 浓盐酸 | 约2 ml | |  | |
| DEPC-H2O | 500 ml | | |  |

用10M NaOH调PH至8.0，**用时再加2.5ml乙酸酐（边加边剧烈搅拌2min左右）。**处理时将样品架放置其中，并轻柔搅拌。

将粘有样品薄片的载玻片放入染色架上，在大染色缸中依次进行如下操作：

（1）二甲苯 10 min

（2）二甲苯 10 min

（3）100%乙醇 1 min

（4）100%乙醇 1 min

（5）95%乙醇 30s

（6）85%乙醇,0.85% NaCl 30s

（7）70%乙醇,0.85% NaCl 30s

（8）50%乙醇,0.85% NaCl 30s

（9）30%乙醇,0.85% NaCl 30s

（10）0.85% NaCl 2min 配Protein K溶液

（11）1×PBS 2min

（12）Protein K溶液（**37℃**） 30min 配甘氨酸溶液

（13）0.2%甘氨酸溶液 2min

（14）1×PBS 2min

（15）1×PBS 2min

（16）4%甲醛溶液 2min

（17）1×PBS 2min

（18）1×PBS 2min

（19）乙酸酐溶液（**轻柔搅拌**） 10min

（20）1×PBS 2min

（21）1×PBS 2min

（22）0.85% NaCl 2min

（23）30%乙醇,0.85% NaCl 30s

（24）50%乙醇,0.85% NaCl 30s

（25）70%乙醇,0.85% NaCl 30s

（26）85%乙醇,0.85% NaCl 30s

（27）95%乙醇 30s

（28）100%乙醇 1 min

（29）100%乙醇 1 min

可在底部含有少量无水乙醇的容器中暂时保存几个小时。

**蛋白酶K消化**:1）使固定后被遮蔽的靶核酸暴露，促进探针与靶核酸接触。

2）消化靶核酸周围的蛋白，提高杂交信号。

**四、杂交及观察**（3～5 day）

稀释探针，配制杂交液，500ml 2×SSC/50%甲酰胺溶液

**相关母液配制**

**10×Salts（灭菌，分装-20℃长期保存）**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 浓度 | Stock | 体积 | |
| NaCl | 3M | 5M | 30 ml | |
| Tris-HCl（pH8.0） | 100mM | 1M | 5 ml | |
| **磷酸钠盐（pH6.8，无需调节）** | 100mM |  |  | |
| **NaH2PO4（119.18g/mol）** |  |  | 0.371 g | |
| **Na2HPO4（141.96g/mol）** |  |  | 0.3285 g | |
| EDTA | 50mM | 0.5M | 5 ml | |
| DEPC-H2O |  |  | 10 ml | |
| 注：先溶解Na2HPO4，再加Tris和NaH2PO4（便于充分溶解） | | | |

**50%硫酸葡聚糖（10ml, 分装-20℃长期保存）**

5g硫酸葡聚糖溶于10 ml DEPC-H2O（可于60℃充分溶解后分装。用时在60℃预热，便于吸取）。

**50×denhardt's（分装，-20℃可以保存2年）**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Ficoll400(1%) | 50mg | 100mg |
| PVP(1%) | 50mg | 100mg |
| BSA(1%) | 50mg | 100mg |
| DEPC-H2O | 5ml | 10ml |

**20×SSC（1L 灭菌）**

|  |  |
| --- | --- |
| 3M NaCl | 175.3 g |
| 0.3M 柠檬酸钠（294.1g/mol） | 88.2 g |
| 纯水 | 先加约800 ml |
| 用盐酸调pH至7.0，定容至1L。 |  |

**相关试剂配制**

**探针稀释**

1 slide =1μl稀释后探针（将制备好的探针用50%甲酰胺稀释5或10倍）**杂交液**（用剪过的枪头吸，60张片子配10 ml）

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | 10张片子 | 20张片子 | 100张片子 |
| 10×Salts | 100 μl | 200 μl | 1 ml |
| 100%甲酰胺（formamide） | 500 μl | 1 ml | 5 ml |
| 50%硫酸葡聚糖（dextran sulfate) | 200 μl | 400 μl | 2 ml |
| 50×denhardt's | 20 μl | 40 μl | 200 μl |
| 100mg/ml tRNA | 10 μl | 20 μl | 100 μl |
| DEPC-H2O | 170 μl | 340 μl | 1.7 ml |
| 总体积 | 1 ml | 2 ml | **10 ml** |

硫酸葡聚糖粘稠，用剪过的枪头吸取。

**2×SSC/50% 甲酰胺（500ml）**

|  |  |
| --- | --- |
| 20×SSC | 50 ml |
| 甲酰胺 | 250 ml |
| DEPC-H2O | 200 ml |
| 总体积 | 500 ml |

1. **杂交**（下午开始，大概操作一个小时，50℃杂交16至20h。）：
2. 将载玻片从染色架移至玻片板上于室温晾干5-10min。
3. 同时将稀释后的探针（1μl探针+23μl 50%甲酰胺）80℃变性 2 min，立即置于冰上 2-3 min（**防止复性**），瞬离。加入**96μl**杂交液(4 Vol)，用剪过的枪头吸打混匀。
4. 在免疫组化湿盒中垫上双层吸水纸，用2×SSC/50%甲酰胺溶液将吸水纸浸湿，并喷洒去RNAse溶液。
5. 每张载玻片加入杂交混合液 120 μl，待液体完全覆盖样品后盖上盖玻片。（加一张片子盖一张，随即放入湿盒中）
6. 将湿盒中用胶带密封，置于50℃过夜。

**杂交液**：

较高浓度的Na+，可提高杂交效率，降低探针与标本之间的静电结合。

甲酰胺降低Tm值，可避免温度过高引起的组织形态结构破坏及标本的脱落。

硫酸葡聚糖能与水结合，减少杂交液的有效容积，提高探针的有效浓度，从而提高杂交效率。

tRNA可以阻断探针与组织结构成分间的非特异性结合。

第二天（9:00开始）

先将10×封闭液（Roche）置于60℃溶解(溶解后即配制10%封闭液)，4L 1%BSA/0.3%triton X-100置于（60℃ 1h以上，搅拌均匀）。待充分溶解后冷却至室温待用。

配制2L 0.2×SSC，2L 1×NTE（37℃提前预热），500ml含20μg /ml RNase A 的 1×NTE （37℃提前预热），500ml1×TBS, ,抗体溶液，1L bufferC，20ml底物溶液（NBT/BCIP）

**相关母液配制**

**10×TBS（灭菌 ）**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 1.5M NaCl | 87.66 g | 43.83 g |
| 1M Tris-HCl(**pH 7.5** ) | 至1L | 至500ml |

**2M MgCl2（灭菌）**

203.3g MgCl2.6H2O溶于纯水中定容至500ml，加0.5ml DEPC处理。

**5M NaCl（灭菌）**

146.1g NaCl溶于纯水中定容至500ml，加0.5ml DEPC处理。

**相关试剂配制**

**1×NTE**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | 工作液浓度 | Stock | 体积(1L) |
| NaCl | 0.5M | 5M | 100 ml |
| Tris-HCl pH7.5 | 10mM | 1M | 10 ml |
| EDTA | 1mM | 0.5M | 2 ml |
| DEPC-H2O |  |  | 定容至1L |

**1×NTE（含20μg/ml RNaseA）**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | 工作液浓度 | Stock | 体积(500 ml) |
| NaCl | 0.5M | 5M | 50 ml |
| Tris-HCl pH7.5 | 10mM | 1M | 5 ml |
| EDTA | 1mM | 0.5M | 1 ml |
| RNaseA | 20μg/ml | 100mg/ml | 1ml |
| DEPC-H2O |  |  | 定容至500 ml |

**10%封闭液（60℃溶解充分，冷却至室温）**

|  |  |
| --- | --- |
| 10×TBS | 50 ml |
| 10×Blocking Buffer | 5 ml |
| DEPC-H2O | 至500 ml |

注：先加10×TBS混匀，再加blocking Buffer，若10×TBS pH未调封闭液很难溶解充分。

**1%BSA/0.3%triton X-100**

|  |  |
| --- | --- |
| BSA | 10 g |
| Triton X-100 | 3 ml |
| 10×TBS | 100 ml |
| DEPC-H2O | 定容至1L |

注：先加10×TBS混匀，再加Triton X-100搅匀，最后加BSA，室温即可搅拌均匀。

**抗体溶液**

用1%BSA/0.3%triton X-100溶液按1:1250稀释，每张片子3×120μl（润洗两次，孵育一次）。60张片子，配25ml抗体溶液。即加20μl抗体。

**Buffer C**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | 工作液浓度 | Stock | 体积(1L) |
| Tris-HCl pH9.5 | 100mM | 1M | 100 ml |
| MgCl2 | 50mM | 2M | 25 ml |
| NaCl | 100mM | 5M | 20 ml |
| DEPC-H2O |  |  | 定容至1L |

**NBT/BCIP底物溶液（避光）**

吸取NBT/BCIP 200μl(Roche)于10ml Buffer C溶液中，混匀，遮光。每个考普林杯中可放10张片子，需2-3ml底物溶液。60张片子需配20ml 底物溶液。（每10ml底物溶液中含2250μg NBT和1750μg BCIP。）

**注: NBT/BCIP -20℃保存有沉淀，用枪吸打几次即可，无需完全溶解。**

1. **显色**：
2. 在 55℃预热的 0.2×SSC 中去掉盖玻片，将载玻片重新放入染色架中，在 0.2×SSC 中,55℃静置1h 。
3. 更换新的0.2×SSC，55℃静置1h。
4. 转入1×NTE中，37℃处理5min。
5. 重复3）。
6. 在含有 20μg /ml RNase A 的 1×NTE 中 37℃处理 30 min。
7. 换用新的1×NTE清洗，37℃下，放置5min。
8. 再用1×NTE清洗1次。
9. 转入0.2×SSC 中，55℃静置1h。（此时配制1L 1%封闭液，60℃下溶解）
10. 转入1×TBS中，室温漂洗5min。
11. 将将载玻片摆放在托盘内(60张片子，2个托盘)，加入适量Roche封闭液（2个托盘1L），室温下摇床上孵育1h。（转速不宜过大）
12. 倒掉封闭液，加入1%BSA/0.3%triton X-100溶液，室温下摇床上孵育45min。
13. 倒掉9）中液体，将载玻片转移至玻片板上，用120μl 抗体溶液冲洗2次，甩干。在样品上加入120μl抗体，盖上盖玻片，转入加有适量1%BSA/0.3%triton X-100溶液的湿盒中，室温下孵育2h。（**洗一张片子，盖一张片子**）
14. 在1%BSA/0.3%triton X-100溶液中去掉盖玻片，将载玻片重新放到托盘中，室温下摇床上用1%BSA/0.3%triton X-100溶液清洗4次，每次15min。
15. 转入buffer C室温下摇床上清洗5min。
16. 重复14）。
17. 将切片用120μl底物溶液润洗后，两个对贴在一起，转入底部加有2-3ml底物溶液的考普林杯中显色（每个杯中可放10张片子），用胶布密封，放置于黑暗环境中，室温下1-3d显色。（显色时间与基因表达强度有关，最长不超过3d，组蛋白1-2h即可）。

第三天以后

配50 mlbuffer C溶液, 50 ml 1×TE，梯度乙醇各50 ml（用纯水配制即可）

**1×TE**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 1M Tris-HCl pH7.5 | 10 ml | 500 μl |
| 0.5M EDTA | 2 ml | 100 μl |
| 水 | 至1L | 至50 ml |

**观察**。在buffer C溶液中将两张片子分开。将分开后的玻片在1×TE中漂洗2次，然后进行乙醇梯度脱水(依次为30%、50%、70%、85%、95%，100%、100%，每步各5s),再用二甲苯漂洗2次，之后用加拿大树胶封片，晾干后即可于显微镜下观察拍照。

**相关母液清单**

1、8.5% NaCl 1L

2、10×PBS 1L

3、1M Tris-HCl

pH7.5 2L

pH8.0 1L

pH9.5 1L

4、0.5M EDTA（pH8.0） 1L

5、20×SSC 1L

6、10×TBS 1L

7、2M MgCl2 1L

8、5M NaCl 1L

用量少，分装-20℃长期保存。

1、2×碳酸盐缓冲液

1M NaHCO3

1M Na2CO3

2、4M NH4Ac（抽滤灭菌）

3、3M NaAc（pH5.2）

4、50%甲酰胺

5、10×Salts

6、50×denhardt’s

7、50%硫酸葡聚糖