



GENESEED® circRNA/miRNA In situ hybridization test kit (DIG, Red)

产品规格

产品名称	货号	规格
GENESEED® circRNA/miRNA In situ hybridization test kit (DIG, Red)	H0103	50T

应用范围

1. 探针: Digoxin 标记的 circRNA/miRNA 探针;
2. 标本: 石蜡组织切片、细胞爬片、滴片、涂片、冰冻切片。

试剂盒组成

试剂组分	规格	数量	储存
Solution A	15 mL	1	4°C
Solution B	15 mL	1	4°C
Solution C	15 mL	1	4°C
circRNA/miRNA Hybridization Buffer	10 mL	1	4°C
Blocking Buffer I	10 mL	1	4°C
Washing Buffer(10×)	50 mL	4	4°C
Anti-Digoxin, CY3-Conjugate	50 µL	1	-20°C, 避光
DAPI-Antifade Solution	1 mL	1	-20°C, 避光

- 注意: 1. circRNA/miRNA Hybridization Buffer 低温储存时冻结, 需 37°C 水浴至完全溶解后混匀使用;
2. Washing Buffer(10×), 稀释前必须摇匀, 摇匀后呈浑浊白色液态, 稀释后变澄清, 且有少量泡沫;
3. Anti-Digoxin, CY3-Conjugate 和 DAPI-Antifade Solution 注意-20°C避光保存;

需要自备的试剂、耗材和仪器

circRNA/miRNA 探针、二甲苯或其替代品、100%/85%/70%乙醇、4%多聚甲醛、FISH 封片胶 (烘箱杂交时可不使用)、0.1% DEPC 水、PBS pH7.0 (使用 DEPC 水配制);

盖玻片、染缸、镊子、避光湿盒、0.2mL 离心管; 恒温箱、水浴锅、荧光显微镜。



实验步骤

(以下步骤是常规步骤，根据不同标本类型及固定试剂等要进行条件优化。需要对 Solution A、Solution B、Solution C 进行试剂的延长或者缩短，实验中使用的 PBS 均使用 DEPC 水配制。)

DAY 1

1. 预处理

1) 石蜡组织切片：二甲苯脱蜡，5min/次，3次；依次浸入无水乙醇、85%乙醇、70%乙醇各5min；随后浸入 PBS，5min/次，1次；

2) 细胞爬片、滴片、涂片：固定后，浸入 PBS，5min/次，1次

3) 冰冻切片：将冷冻在-70°C的标本，拿出后立即用4%多聚甲醛重新固定15min（避免在重新固定前切片恢复室温）。浸入 PBS，5min/次，1次；

2. 将 Solution A 滴加在标本上，室温静置 20min（根据标本的薄厚、标本类型、标本老化程度可适当调整时间）；

3. 吸去 Solution A，滴加 Solution B，室温静置 15min（根据标本的薄厚、标本类型、标本老化程度可适当调整时间）；

4. 吸去 Solution B，在 PBS 溶液中浸泡 5min；滴加 Solution C，室温静置 15min（根据标本的薄厚、标本类型、标本老化程度可适当调整时间），用 PBS 洗涤 5min；

5. 甩去残留在标本上的 PBS，在标本上滴加 4%多聚甲醛，室温固定 15min（建议在通风橱中进行）；

6. 吸去 4%多聚甲醛，在 PBS 溶液中浸泡 5min，洗涤后甩去残留 PBS；

7. 预杂交

在标本上滴加 50 ~ 100 μ L circRNA/miRNA Hybridization Buffer，盖上盖玻片，放入湿盒中，于恒温箱中 55°C预杂交 1 小时；

8. 准备探针

预杂交快结束时，将探针与 circRNA/miRNA Hybridization Buffer 按 1:50 ~ 200 稀释（具体稀释比例根据实际实验情况调整），混合均匀后，85°C变性 3min，4°C平衡 2min；

9. 杂交

预杂交结束后，吸去标本上的 circRNA/miRNA Hybridization Buffer，滴加 20 ~ 50 μ L 平衡后的探针，盖上盖玻片，用 FISH 封片胶封片，37°C ~ 42°C杂交 16 ~ 72 小时；



Day 2

10. 洗涤

Washing Buffer(10×) 与 0.1% DEPC 水按 1 : 9 混合均匀, 配成工作液, 揭去 FISH 封片胶, 将标本放入 Washing Buffer 工作液中, 洗涤至盖玻片自动脱落, 再将标本移至新的 Washing Buffer 工作液 (预热至 42°C), 洗涤 2min, 再移到室温的 Washing Buffer 工作液, 洗涤 8min (常温洗涤时间和次数可根据实际实验适当调整, 但不可过长, 如若背景过高, 洗涤时可适当摇晃);

11. 吸去残留的 Washing Buffer, 在标本上滴加 Blocking Buffer I, 可不加盖玻片, 但要保证标本不会变干, 放入湿盒中, 37°C 孵育 1 小时;

以下步骤注意避光

12. 吸去残留的 Blocking Buffer I, 将 Anti-Digoxin, CY3-Conjugate 与 Blocking Buffer I 按 1: 50 ~ 200 稀释, 混匀后加 2 ~ 3 滴至标本上, 盖上盖玻片, 放入湿盒中, 在暗处 37°C 孵育约 1 小时;

13. 将标本浸入 PBS 中, 待盖玻片自动脱落后, 移至新的 PBS, 洗涤 7min/次, 2 次, 吸去残留 PBS, 室温避光干燥;

14. 加 20μL DAPI- Antifade Solution 复染, 盖上盖玻片;

15. 置于暗处反应 20min, 在荧光显微镜下观察结果; DAPI 呈深蓝色荧光($A_{max} = 358, E_{max} = 461$), 探针呈红色荧光($A_{max} = 555nm, E_{max} = 570nm$)。

注: 镜下观察需要考虑滤光片和显微镜调节, 请仔细观察; 如不能及时观察结果, 请将标本置于标本盒, 用锡纸包好, -20°C 冰箱放置, 此方法储存的标本的荧光信号约可保留 2 个月。

注意事项:

- 1) 实验过程中部分试剂对人体有害, 请注意穿着实验服和佩戴手套;
- 2) 冬季室温温度较低, 可适当延长反应时间或置恒温箱中反应;
- 3) 滴加于标本上的试剂应覆盖整个标本, 防止因试剂孵育不全而引起结果的偏差 (可在滴加试剂后加盖盖玻片或封口膜);
- 4) 本产品只供实验研究使用, 不能应用于临床诊断或治疗。