



GENESEED® mRNA/lncRNA Fluorescent In situ hybridization test kit

产品规格

产品名称	货号	规格
GENESEED® mRNA/lncRNA Fluorescent In situ hybridization test kit	H0201	50T

应用范围

1. 探针：荧光基团（Cy3、Cy5、FITC、Texas Red、Alex Fluor488、AMCA 等）直接标记 mRNA/lncRNA 探针；
2. 标本：石蜡组织切片、细胞爬片、细胞涂片或滴片、冰冻切片。

试剂盒组成

试剂组分	规格	数量	储存
Solution A	15mL	1	4°C
Solution B	15mL	1	4°C
Solution C	15mL	1	4°C
mRNA/lncRNA Hybridization Buffer	10mL	1	4°C
Blocking Buffer	10mL	1	4°C
Washing Buffer (10×)	50mL	4	4°C
DAPI-Antifade Solution	1mL	1	-20°C, 避光

注意：1. 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；2. DAPI-Antifade Solution 必须-20°C避光储存。



需要自备的试剂、耗材和仪器

mRNA/lncRNA 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、0.2mL 离心管；

避光湿盒、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 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 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）；

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；

5. 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）；PBS 洗涤 5min。甩去残留在片子上的 PBS，在标本上滴加 4%多聚甲醛，室温孵育 10min；

6. 吸去 4%多聚甲醛，在 PBS 溶液中浸泡 5min，2 次，洗涤后甩去残留 PBS；

7. 预杂交

在标本上滴加 50 ~ 100 μL Hybridization Buffer，盖上盖玻片，置于湿盒中，于恒温箱中 55°C 预杂交 2 小时；

8. 准备探针

预杂交快结束时，将探针与 Hybridization Buffer 按 1:50 ~ 200 稀释，混合均匀后， 85°C 变性 3min， 37°C 平衡 2min；



9. 杂交

预杂交结束后，吸去 Hybridization Buffer，滴加 15 ~ 30 μ L 平衡后的探针，盖上盖玻片，用 FISH 封片胶封片，37 $^{\circ}$ C ~ 42 $^{\circ}$ C 杂交 18 ~ 72 小时；

Day 2

10. 洗涤

Washing Buffer(10 \times) 与蒸馏水按 1: 9 混合均匀，配成工作液，揭去 FISH 封片胶，将玻片放入 Washing Buffer 工作液，3 ~ 5min 后，盖玻片会自动脱落，再将玻片移至新的 Washing Buffer 工作液（预热至 42 $^{\circ}$ C），洗涤 2min，再移到室温的 Washing Buffer 工作液，洗涤 8min；

11. 待标本干燥后，滴加 20 μ L DAPI Anti-fade solution，盖上盖玻片后，暗处静置 15min 后，在荧光显微镜下观察。DAPI 呈蓝色荧光 ($A_{max} = 358, E_{max} = 461$)，探针信号呈绿色荧光 ($A_{max} = 496, E_{max} = 524$)。

注：镜下观察需要考虑滤光片和显微镜调节，请仔细观察；如果不能及时观察结果，请将标本置于标本盒，用锡纸包好，-20 $^{\circ}$ 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。