



GENESEED® circRNA/miRNA Fluorescent In situ hybridization test kit

产品规格

产品名称	货号	规格
GENESEED® circRNA/miRNA Fluorescent In situ hybridization test kit	H0101	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 circRNA/miRNA 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	2 ~ 8°C
Solution B	15mL	1	2 ~ 8°C
Solution C	15mL	1	2 ~ 8°C
circRNA/miRNA Hybridization Buffer	10mL	1	2 ~ 8°C
Washing Buffer (10×)	50mL	4	2 ~ 8°C
DAPI-Antifade Solution	1mL	1	-25 ~ -18°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-25 ~ -18°C避光储存。

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：用多聚甲醛固定约20min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50~100μL Hybridization Buffer，盖上盖玻片，放入湿盒中，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15~30μL平衡后的探针，盖上盖玻片，用 FISH 封片胶封片，37°C~42°C杂交18~72小时；



Day 2

10. 洗涤

Washing Buffer(10×) 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°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。

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。