



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

### 产品规格

产品名称	货号	规格
GENESEED® circRNA/miRNA In situ hybridization test kit (DIG, Green)	H0105	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	2 ~ 8°C
Solution B	15 mL	1	2 ~ 8°C
Solution C	15 mL	1	2 ~ 8°C
circRNA/miRNA Hybridization Buffer	10 mL	1	2 ~ 8°C
Blocking Buffer I	10 mL	1	2 ~ 8°C
Washing Buffer (10×)	50 mL	4	2 ~ 8°C
Anti-Digoxin, FITC-Conjugate	50 μL	1	-25 ~ -18°C, 避光
DAPI-Antifade Solution	1 mL	1	-25 ~ -18°C, 避光

- 注意: 1. circRNA/miRNA Hybridization Buffer 低温储存时冻结, 需在 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, FITC Conjugate 和 DAPI-Antifade Solution 注意-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 $-70^{\circ}\text{C}$ 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；

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），使用 PBS 洗涤 5min 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 $\mu\text{L}$  circRNA/miRNA Hybridization Buffer，盖上盖玻片，放入湿盒中，于恒温箱中  $55^{\circ}\text{C}$  预杂交约 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， $85^{\circ}\text{C}$  变性 3min， $4^{\circ}\text{C}$  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 $\mu$ 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 16 ~ 72 小时；

## Day 2

### 10. 洗涤

Washing Buffer (10 $\times$ ) 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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, FITC-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 $^{\circ}$ 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 20 $\mu$ L DAPI- Antifade Solution 复染，盖上盖玻片；

15. 置于暗处反应 20min，荧光显微镜下观察结果；DAPI 呈深蓝色荧光（ $A_{max} = 358, E_{max} = 461$ ），探针呈绿色荧光（ $A_{max} = 492nm, E_{max} = 520nm$ ）。

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 $^{\circ}$ 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。