



GENESEED® circRNA/miRNA In situ hybridization test kit (DIG, HRP-TSA488)

产品规格

产品名称	货号	规格
GENESEED® circRNA/miRNA In situ hybridization test kit (DIG, HRP-TSA488)	H0109	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	15mL	1	2 ~ 8°C
Solution B	15mL	1	2 ~ 8°C
Solution C	15mL	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 HRP Conjugate	50 μL	1	-25 ~ -18°C
TSA-488	50 μL	1	-25 ~ -18°C避光
TSA amplification Buffer	5 mL	1	2 ~ 8°C
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. TSA-488、DAPI-Antifade Solution 必须避光储存。



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、0.1% DEPC 水、3% H_2O_2 (使用甲醇配制)、0.15% H_2O_2 (使用 DEPC 水配制)、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、0.15% H_2O_2 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 $-70^{\circ}C$ 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)，使用 PBS 洗涤 5min；

6. 甩去残留在标本上的 PBS，滴加 3% H_2O_2 ，室温孵育 15min，0.1% DEPC 水洗涤 3min/次，1 次；

7. 甩干标本上的 DEPC 水，在标本上滴加 4%多聚甲醛，室温固定 10min (建议在通风橱中进行)；

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

9. 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 预杂交约 1 小时；

10. 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；

11. 杂交

预杂交结束后，吸去标本上的 circRNA/miRNA Hybridization Buffer，滴加 20 ~ 50μL 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

12. 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）；

13. 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；

14. 吸去残留的 Blocking Buffer I，将 Anti-Digoxin HRP Conjugate 与 Blocking Buffer I 按 1: 100 稀释，混匀后加 2 ~ 3 滴至标本上，盖上盖玻片，放入湿盒中，37°C 孵育约 1 小时；

15. 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；

以下步骤注意避光

16. 配制 TSA 工作液

以 TSA: TSA amplification Buffer: 0.15% H₂O₂=1: (50 ~ 100) : 1 的比例混合均匀，静置 2 ~ 3 min；

17. 往标本上滴加 50 ~ 100μL 配制好的 TSA 工作液，室温避光孵育 8 ~ 15min；

18. PBS 洗涤 5min/次，2 ~ 3 次，晾干，DAPI-Antifade Solution 封片；

19. 置于暗处反应 20min，在荧光显微镜下观察结果；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，-25 ~ -18°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。