



## GENESEED® circRNA/miRNA In situ hybridization test kit (DIG, HRP-TSA555)

### 产品规格

产品名称	货号	规格
GENESEED® circRNA/miRNA In situ hybridization test kit (DIG, HRP-TSA555)	H0107	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-555	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-555、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 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 $\mu$ 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: 200 ~ 1000 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% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>=1: (50~100) : 1 的比例混合均匀, 静置 2 ~ 3min;

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<sub>max</sub> =358, E<sub>max</sub> =461), 探针信号呈红色荧光 (A<sub>max</sub> =555, E<sub>max</sub> =565)。

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。