

# B-N 型 miRNA 原位杂交检测试剂盒

产品编号: D-1607B 规格: 50 T

## 应用范围

探针: Biotin 标记的 miRNA 探针

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	规格	数量	储存
Solution A	10 ml	1	4°C
Solution B	10 ml	1	4°C
miRNA Hybridization Buffer	10 ml	1	-20°C
Blocking Buffer I	5 ml	1	4°C
Blocking Buffer II	10 ml	1	4°C
Washing Buffer (10×)	100 ml	2	RT
Streptavidin-AP	50 µl	1	-20°C
BCIP/NBT 显色液	100 µl	1	-20°C
BCIP/NBT 稀释液	10 ml	1	4°C
核固红染液	5 ml	1	RT
水溶性封片剂	1 ml	2	4°C

注意:

- ① miRNA Hybridization Buffer 及水溶性封片剂低温储存时冻结, 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;

## 需要自备的试剂、耗材与仪器

miRNA 探针; 二甲苯或其替代品; 100%、85%、70%乙醇; 4%多聚甲醛; Rubber Cement;  
0.1% DEPC 水; PBS pH7.0 (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

## 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；后入TBS，5min/次，1次；

#### 2) 细胞爬片、滴片、涂片、

固定后，浸入TBS，5min/次，1次

#### 3) 冰冻切片

浸入TBS，5min/次，1次

### 2. 将 Solution A 滴加在标本上，室温静置 20min；

### 3. 吸去 Solution A，滴加 Solution B，室温静置 15min；

### 4. 吸去 Solution B，在 TBS 溶液中浸泡 5min；

### 5. 甩去残留在标本上的 TBS，在标本上滴加 4%多聚甲醛，室温固定 15min（最好在通风橱中进行）；

### 6. 吸去 4%多聚甲醛，入 TBS 溶液中浸泡 5min，洗涤后甩去残留 TBS；

### 7. 预杂交

在标本上滴加 50-100 $\mu$ l miRNA Hybridization Buffer，盖上盖玻片，放入湿盒中，恒温箱中 55 $^{\circ}$ C 孵育约 1 小时；

### 8. 吸去标本上的 miRNA Hybridization Buffer，在标本上滴加 Blocking Buffer II，可不加盖玻片，但要保证标本不会变干，放入湿盒中，37 $^{\circ}$ C 孵育约 1 小时；

### 9. 吸去 Blocking Buffer II，在 TBS 溶液中洗涤 5min/次，2 次；

### 10. 准备探针

将探针与 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 $^{\circ}$ C 变性 3min，4 $^{\circ}$ C 平衡 2min；

### 11. 杂交

甩去标本上残留的 TBS，滴加 20~50 $\mu$ l 平衡后的探针，盖上盖玻片，用 Rubber Cement 封片，37 $^{\circ}$ C~42 $^{\circ}$ C 杂交 16-72 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 Rubber Cement, 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℃), 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. 将 Streptavidin-AP 和 Blocking Buffer I 按 1: 100~500 稀释, 混匀后加 2~3 滴至标本上, 盖上盖玻片, 放入湿盒中, 37℃ 孵育约 1 小时;

14. 将标本浸入 TBS 中, 待盖玻片自动脱落后, 移至新的 TBS, 洗涤 7min/次, 2 次,

15. 吸去残留的 TBS, 将 BCIP/NBT 用 BCIP/NBT 稀释液按 1: 100 混合, 滴加在标本上 (以完全覆盖标本为准), 室温显色。(阳性结果可根据目的 RNA 的量不同而呈蓝色到紫色, 可放到湿盒中于 37℃ 恒温箱加快显色反应, 但要间隔一段时间就观察显色情况, 如果显色过于缓慢, 可过夜显色, 注意不要让显色液干燥)。

16. 流水洗去显色液中中止显色, 放入 TBS 中洗涤 5min, 甩干 TBS;

17. 滴加核固红染液, 染色 5~10min, 流水洗去染色液, 晾干;

18. 水溶性封片液封片。(水溶性封片液封片不能永久保存, 建议尽快拍照保存。若需保存较长时间, 可存放于 4℃)。

## 注意事项

- 1) 实验过程中部分试剂对人体有害, 请注意穿戴实验服和配戴手套;
- 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。

广州市外显子生物技术有限公司

广州市海珠区敦和路 189 号留学人员创业基地 1 栋 308 室

技术支持: focobiolab@126.com Tel: 86-020-89269730

订购产品: focobio@126.com; Tel: 86-020-89895006