

# D-G 型 miRNA 原位杂交检测试剂盒

产品编号：D-2406B 规格：50T

## 应用范围

探针：Digoxin 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℃
Solution B	10 ml	1	4℃
miRNA Hybridization Buffer	10 ml	1	-20℃
Blocking Buffer I	10 ml	1	4℃
Washing Buffer (10×)	100 ml	2	4℃
Anti-Digoxin, FITC-Conjugate	50 μl	1	-20℃, 避光
DAPI-Antifade Solution	1 ml	1	-20℃, 避光

注意：

- ① miRNA Hybridization Buffer 低温储存时冻结，需在 37℃ 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 注意避光保存；

## 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 PBS, 5min/次, 1次;

##### 2) 细胞爬片、滴片、涂片、

固定后, 浸入 PBS, 5min/次, 1次

##### 3) 冰冻切片

浸入 PBS, 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 PBS 溶液中浸泡 5min;

#### 5. 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(最好在通风橱中进行);

#### 6. 吸去 4%多聚甲醛, 入 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 $\mu$ 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. 准备探针

预杂交快结束时, 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;

#### 9. 杂交

预杂交结束后, 吸去标本上的 miRNA Hybridization Buffer, 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

### 10. 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);

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℃ 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℃ 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 20μl 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 (Amax =358, Emax =461), 探针呈绿色荧光 (Amax =492nm, Emax =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℃ 冰箱放置, 此方法储存的标本的荧光信号大概能保留 2 个月以上。

## 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