

D-T-R 型 miRNA 原位杂交检测试剂盒

产品编号: D-2922B 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°C
Solution B	10 ml	1	4°C
miRNA Hybridization Buffer	10 ml	1	-20°C
Blocking Buffer I	10 ml	1	4°C
Washing Buffer (10×)	100 ml	2	4°C
Anti-Digoxin HRP Conjugate	50 µl	1	-20°C
TSA-555	50 µl	1	-20°C 避光
TSA amplification Buffer	5 ml	1	4°C
DAPI-Antifade Solution	1 ml	1	-20°C 避光

注意:

- ① 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; 3% H₂O₂ (甲醇配制); 0.15% H₂O₂ (DEPC 水配制); 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，滴加 3% H_2O_2 ，室温孵育 15min，0.1%DEPC 水洗涤 3min/次，1次；

6. 甩干标本上的 DEPC 水，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）；

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

8. 预杂交

在标本上滴加 50-100 μ 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；

9. 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；

10. 杂交

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

11. 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 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）；

12. 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；
13. 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℃ 孵育约 1 小时；
14. 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

15. 配置 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；

16. 往标本上滴加 50~100 μl 配置好的 TSA 工作液，室温避光孵育 8~15min。

17. PBS 洗涤 5min/次，2-3 次，晾干，DAPI- Antifade Solution 封片。

18. 置于暗处反应 20min，显微镜观察结果；DAPI 呈蓝色荧光（A_{max} =358,E_{max} =461），探针信号呈红色荧光（A_{max} =555,E_{max} =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，-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