

G 型 miRNA 原位杂交检测试剂盒

产品编号：D-0010 规格：50 T

应用范围

探针：荧光基团（Cy3、Cy5、FITC、Texas Red、Alex Fluor488、AMCA 等）直接标记的或者是客户自备二抗的地高辛、生物素标记的 miRNA、mRNA 探针。

标本：石蜡组织切片、细胞爬片、细胞涂片或滴片、冰冻切片

试剂盒组成

试剂	规格	数量	储存
Solution A	10ml	1	4℃
Solution B	10ml	1	4℃
mRNA/miRNA Hybridization Buffer	10ml	1	-20℃
Blocking Buffer	10ml	1	4℃
Washing Buffer (10×)	100ml	2	RT
DAPI-Antifade Solution	1ml	1	-20℃, 避光

注意：

1. 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；
2. DAPI-Antifade Solution 必须避光储存。

需要自备的试剂、耗材与仪器

mRNA/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

- 石蜡组织切片

二甲苯脱蜡，5min/次，3次；无水乙醇、85%乙醇、70%乙醇依次5min；浸入PBS，5min/次，1次

- 细胞爬片

4%多聚甲醛固定后浸入PBS，5min/次，1次

- 细胞涂片或滴片、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. 甩去残留在片子上的 PBS，在标本上滴加 4%多聚甲醛，室温孵育 15min；

6. 吸去 4%多聚甲醛，在 PBS 溶液中浸泡 5min，2次，洗涤后甩去残留 PBS；

7. 预杂交

在标本上滴加 50-100 μ l Hybridization Buffer，盖上盖玻片，置于湿盒中，于恒温箱 55 $^{\circ}$ C 预杂交 2 小时；

8. 准备探针

预杂交快结束时，将探针与 Hybridization Buffer 按 1:50~200 稀释，混合均匀后，85 $^{\circ}$ C 变性 3min，37 $^{\circ}$ C 平衡 2min；

9. 杂交

预杂交结束后，吸去 Hybridization Buffer，滴加 15~30 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

10. 洗涤

Washing Buffer (10×) 与蒸馏水按 1: 9 混合均匀, 配成工作液, 揭去 Rubber Cement, 将玻片放入 Washing Buffer 工作液, 3-5min 后, 盖玻片会自动脱落, 再将玻片移至新的 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 (直接荧光标记探针可转到步骤 14);

(地高辛或生物素标记探针) 11. 吸去残留的 Washing Buffer, 在标本上滴加 Blocking Buffer, 可不加盖玻片, 但要保证标本不会变干, 放入湿盒中, 37℃ 孵育 30min;

12. 吸去残留的 Blocking Buffer, 将荧光二抗与 Blocking Buffer 按二抗说明书稀释后, 滴加 2~3 滴至标本上, 加盖玻片, 放入湿盒, 在暗处 37℃ 孵育 30min~1 小时;

13. 将玻片浸入 PBS 中, 待盖玻片自动脱落后, 移至新的 PBS, 洗涤 7min/次, 2 次, 甩干残留 PBS;

14. 标本干燥后, 滴加 20μl DAPI Anti-fade solution, 盖上盖玻片后, 暗处静置 15min 后, 荧光显微镜下观察。

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