



免疫荧光实验指南

一、固定和透化

1. 在培养板中将已爬好细胞的盖玻片用 $1 \times$ PBS 浸洗 3 次，每次 3 min。
2. 用 4% 的多聚甲醛固定爬片 15 min， $1 \times$ PBS 浸洗玻片 3 次，每次 3 min。
3. 0.5% Triton X-100($1 \times$ PBS 配制) 室温通透细胞 15min (细胞膜上表达的抗原省略此步骤)， $1 \times$ PBS 浸洗玻片 3 次，每次 3min。

二、封闭

4. 吸水纸吸干 $1 \times$ PBS，在玻片上滴加 5% 的正常血清 (与二抗种属来源一致或相似)，室温封闭 1h。

三、抗体孵育

5. 吸水纸吸掉封闭液，不洗，每张玻片滴加足够量的稀释好的一抗并放入湿盒， 4°C 孵育过夜。
6. 加荧光二抗：PBST 浸洗爬片 3 次，每次 3 min，吸水纸吸干爬片上多余液体后滴加稀释好的荧光二抗，湿盒中 37°C 孵育 1h，PBST 浸洗爬片 3 次，每次 3 min。

注意：从加荧光二抗起，后面所有操作步骤都尽量在较暗处进行。

四、固定拍照

7. 复染核：滴加 DAPI 避光孵育 5min，对标本进行染核，PBST $5 \text{ min} \times 4$ 次洗去多余的 DAPI。
8. 用吸水纸吸干爬片上的液体，用含抗荧光淬灭剂的封片液封片，在荧光显微镜下观察采集图像。