

细胞爬片免疫荧光实验报告

一、实验器材及试剂

1. 实验器材

名称	厂家	型号
载玻片	陕西依科生物技术服务有限公司	YK116
盖玻片	江苏世泰实验器材有限公司	10212432c
脱色摇床	北京市六一仪器厂	WD-9405A
涡旋混合器	天悦电子	TYXH-II
移液枪	Dragon	KE0003087/KA0056573
组化笔	福州迈新	PEN-0002
正置显微镜	日本尼康	ci-s
扫描仪（白光、荧光）	3DHISTEC	PannoramicMIDI

2. 主要实验试剂

试剂	厂家
TritonX-100	陕西依科生物技术服务有限公司
PBS 缓冲液	陕西依科生物技术服务有限公司
BSA	BioFROXX 货号 EZ2811C238
一抗	客户提供
二抗	壮志生物
抗荧光淬灭剂	博士德
DAPI	MCE HY-D0814

二、免疫荧光染色实验原理及步骤

实验原理 免疫学的基本反应是抗原-抗体反应。由于抗原抗体反应具有高度的特异性，所以当抗原抗体发生反应时，只要知道其中的一个因素，就可以查出另一个因素。免疫荧光技术就是将不影响抗原抗体活性的荧光色素标记在抗体（或抗原）上，与其相应的抗原（或抗体）结合后，在荧光显微镜下呈现一种特异性荧光反应。

免疫荧光染色实验步骤

- 1. 细胞固定：**细胞爬片弃掉培养基，PBS 洗 2 遍，4%多聚甲醛固定 15min，PBS 洗 2 次，5min/次；
- 2. 通透：**细胞爬片加细胞通透液 0.3%TritonX-100 15min，PBS 洗 3 次，每次 5min；
- 3. BSA 或者血清封闭：**在孔内滴加用 5%BSA，室温封闭 1h；

4. **加一抗:** 用组化笔在载玻片上画圈（防止抗体流走），圈内滴加稀释好的一抗，把爬片拿出倒扣在玻片上，平放于湿盒内 4° C 孵育过夜（湿盒内加少量水防止抗体蒸发）；
5. **加二抗:** 玻片置于 PBS（PH7.4）中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次，每次 8min。切片稍干后在圈内滴加与种属对应的荧光二抗，覆盖组织，室温孵育 120min。之后玻片置于 PBS（PH7.4）中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次，每次 8min；
6. **DAPI 染核:** 滴加 DAPI，室温孵育 10min，之后玻片置于 PBS（PH7.4）中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次，每次 6min；
7. **封片:** 抗荧光淬灭剂封片；
8. **镜检拍照:** 切片于荧光显微镜下观察并采集图像。（DAPI 紫外激发波长 330-380nm，发射波长 420nm，发蓝光；FITC 激发波长 465-495nm，发射波长 515-555 nm，发绿光；CY3 激发波长 510-560，发射波长 590nm，发红光）。

三、染色结果判读: DAPI 染出来的细胞核在紫外的激发下为蓝色，阳性表达为相应荧光素标记的红光或者绿光。