

湖北百奥斯 (Biossci) 生物科技有限公司
武汉长衍病理科技有限公司

免疫荧光三标实验报告 (细胞爬片)

一、实验器材及试剂

1、实验器材

名称	厂家	型号
防脱载玻片	湖北百奥斯生物科技有限公司	BP0510
荧光显微镜	奥林巴斯有限公司	BX53
成像系统	3D HISTECH	Pannoramic SCAN II
移液枪	大龙兴创实验仪器 (北京) 股份有限公司	YE169AA0033229
组化笔	福州迈新生物技术开发有限公司	PEN-0002

2、主要试剂及货号

名称	厂家	货号
无水乙醇	国药集团化学试剂有限公司	100092683
Triton® X-100 破膜液	BioFroxx	1139ML100
正常驴血清	AntGene	ANT051
TBS 缓冲盐粉	湖北百奥斯生物科技有限公司	BP0152
DAPI 溶液	Solarbio	C0060
荧光封片剂	Southern Biotech	0100-01

3、抗体信息

(1) 一抗信息

名称	公司	货号	浓度	修复方式	孵育条件

湖北百奥斯 (Biossci) 生物科技有限公司
武汉长衍病理科技有限公司

(2) 二抗信息

名称	公司	货号	浓度	孵育条件

注：一抗及二抗信息根据具体实验条件填写。

二、实验步骤

- 1、细胞爬片固定：**未经固定的细胞用 4%多聚甲醛固定 10 分钟。已固定的细胞室温放置 10 分钟，蒸馏水洗。用组化笔在爬片边缘画圈。
- 2、破膜：**用 0.1%Triton®X-100 破膜 15 分钟。TBST 洗 3 次，每次 5 分钟。
- 3、封闭：**滴加与二抗来源一致的 10%血清，37℃孵育 30 分钟。
- 4、孵育一抗：**除去血清，分别取 3 种一抗原液，用 TBST 稀释，配制成一抗工作液，每张爬片滴加 50-100μl（视细胞爬片大小而定）一抗工作液，4℃孵育过夜。
- 5、孵育二抗：**第二天从冰箱拿出爬片，置于室温放置 15 分钟（复温），用 TBST 冲洗 3 次，再浸洗 3 次，每次 3 分钟。分别取 3 种二抗原液，用 TBST 稀释，配制成二抗工作液，每张爬片滴加 50-100μl（视细胞爬片大小而定）二抗工作液，37℃孵育 45 分钟。TBST 冲洗 3 次，再浸洗 3 次，每次 3 分钟。
- 6、染核：**除去 TBST，每张爬片滴加 50-100μl（视细胞爬片大小而定）DAPI 工作液（用 DAPI 原液 1:500 配制），避光染核 5 分钟后，用 TBST 冲洗。
- 7、封片：**用荧光封片剂封片，4℃避光保存。
- 8、镜检：**显微镜下镜检，图像采集分析。

三、结果判读

DAPI 通道细胞核为蓝色，488 通道阳性为绿色，555 通道阳性为橙红色，594 通道阳性为红色，647 通道阳性为紫红色。

四、注意事项

湖北百奥斯 (Biossci) 生物科技有限公司
武汉长衍病理科技有限公司

- 1、冲洗时不应直接将 TBST 对准爬片，应将喷壶嘴对准孔板壁让水顺板壁流下，避免将爬片上的细胞冲洗掉。
- 2、实验过程中注意做好标记，在培养皿侧面画上标记，避免将爬片弄混，每个孔的爬片、孔板与孔板盖都应做好标记。