

实验步骤: 免疫细胞化学/免疫荧光染色 (ICC/IF)

材料/试剂/缓冲液

1. 0.1 N HCl (盐酸)
2. Ethanol (乙醇)
3. 24孔盘
4. 盖玻片
5. Methanol (甲醇)
6. 4% paraformaldehyde (PFA): 溶于PBS
7. 一抗
8. HRP标记二抗
9. 涂层溶液: 0.01 % Poly-L-Lysine或0.1 % gelatin (明胶)
10. DAPI (GTX16206)
11. 抗荧光淬灭封片溶液 (GTX28214)或 Fluoroshield™ with DAPI (GTX30920)
12. 磷酸盐缓冲液 (PBS)
13. 封闭液: 5% 血清或3% BSA (溶于PBS)

方法

A. 盖玻片制备

1. 将盖玻片浸泡于0.1 N盐酸溶液中, 置于室温过夜
2. 以去离子水清洗玻片三次
3. 将盖玻片浸泡在95%乙醇中, 置于室温过夜
4. 去除盖玻片上多余的乙醇, 在空气中风干盖玻片
5. 高压灭菌后备用, 如要立即使用可将盖玻片用酒精灯短暂加热

B. 盖玻片涂层 (可略过)

Poly-L-Lysine涂层

1. 加入0.01% Poly-L-Lysine溶液静置于室温1小时
2. 吸除多余涂层溶液, 在空气中风干2小时即可接种细胞

明胶涂层

1. 加入0.1%明胶溶液静置于室温20分钟
2. 吸除明胶溶液, 并用PBS润洗盖玻片备用

C. 细胞接种、固定与渗透

1. 将盖玻片置于24孔盘中, 接种适量细胞于24孔盘, 培养至适当密度
2. 去除培养基, 以PBS润洗细胞两次
3. 以甲醇或4% PFA固定细胞
 - 3.1 每个孔加入1毫升-20°C预冷的甲醇, 将24孔盘移入-20°C冰箱静置5-10分钟, 接着吸除甲醇, 以PBS润洗细胞一次(跳至步骤5)
 - 3.2 加入0.5毫升4% PFA, 于室温静置10分钟, 接着吸除PFA, 以PBS润洗细胞一次
4. 加入37°C预热的0.1% Triton X-100 (溶于PBS)或0.5% Saponin/PBS于室温静置15分钟以渗透细胞
注意: 如果是用甲醇固定细胞可跳过此步骤
5. 以PBS润洗细胞、清洗三次, 每次3分钟

D. 封闭与免疫染色

1. 在固定后的细胞中加入封闭液于室温封闭1小时
注意: 建议使用与二抗宿主来源相同物种的血清
2. 根据产品说明书建议的稀释倍数将一抗加入封闭液中
3. 室温放置1小时或4°C过夜(较建议此法), 以进行杂交反应
4. 以PBS润洗细胞、清洗三次, 每次3分钟
5. 将稀释于封闭液中的二抗加入细胞玻片, 放置于室温1小时
注意: 如果是荧光标记的二抗, 从此步骤开始及之后的步骤需要避光
6. 以PBS润洗细胞、清洗三次, 每次3分钟

E. 对比染色与封片

1. 在载玻片上滴上防淬灭Fluoroshield™ with DAPI (GTX30920)封片溶液, 将盖玻片细胞面朝向封片溶液以染色DNA
2. 替代方案
 - 2-1 加入0.1-1 ug/ml Hoechst 33342或DAPI于室温反应5分钟, 进行细胞核染色
 - 2-2 以PBS润洗细胞两次
 - 2-3 在载玻片上滴加防淬灭封片溶液(GTX28214), 盖上盖玻片



GeneTex 简介

ABOUT

GeneTex 背景

1997年GeneTex由一群科学家成立于美国德克萨斯州,为抗体制造商,成立宗旨“专注生物相关试剂生产,加速科学研究与发展,在每一个产品里你将看到我们对质量的要求与坚持”。

成立之初,科学家致力于寻找引发癌症的分子新靶点,并开发抗体供科研使用。之后, GeneTex专注抗体开发,网罗世界各地人才,至今已开发出50,000个产品,产品线横跨癌症、病毒、遗传学、神经学、免疫学、细胞分子传递、干细胞研究、斑马鱼等多个领域,并提供完善的定制抗体制备服务。

GeneTex 承诺

在我们制造产品时,坚持我们的理念与方法,通过研究、开发与严格的测试提供最可信的试剂给研究人员,并驱动生命科学的发展。我们将持续开发多元的抗体产品,提供科学家探索有限生物医药知识所使用。

GeneTex 联系

任何跟产品相关的问题,我们技术与销售团队将竭诚为您服务; GeneTex支持中英文等多种语言并建构全球经销商网络,任何问题,您可以使用习惯的语言与我们联络。

