

实验步骤: 冰冻切片免疫组化染色 (IHC-Fr)

材料/试剂/缓冲液

1. 冰冻组织切片
2. 4% paraformaldehyde (PFA): 溶于PBS
3. 30% 蔗糖: 溶于PBS
4. OCT
5. 模型
6. 干冰
7. Poly-L-Lysine涂层的载玻片
8. 用于免疫组化的疏水性阻隔笔 (GTX22601)
9. 一抗
10. 标记二抗
11. 封闭液: 5-10 % 正常动物血清 (normal animal serum) + 0.5 % Triton X-100 (溶于PBS)
12. DAPI (GTX16206)
13. 防淬灭封片溶液 (GTX28214)或 Fluoroshield™ with DAPI (GTX30920)
14. 磷酸盐缓冲液 (PBS)

方法

A. 组织制备与固定

1. 用制备好的4% PFA灌注动物或将解剖好的组织浸泡于4% PFA, 放置于室温4-24小时, 以使组织固定
注意: 固定的温度与时间, 视组织类型与大小而定, 可依照实验需求调整优化
2. 将组织孵育在30% 蔗糖溶液中以冷冻保护组织, 使组织下沉至管底
注意: 组织越大下沉时间越久
3. 移除组织上多余的蔗糖, 将组织放置于装满OCT的模型中间
4. 将包埋模型里的组织转至想要的切面与方向
5. 用干冰冰冻组织块
6. 将组织块置于-80°C, 之后即可进行切片
注意: 组织块可于-80°C存放6-12个月

B. 冰冻切片组织切片

1. 将包埋好的组织块从冰箱移至冰冻切片机, 放置在切片操作室中大约30分钟, 使其温度达到平衡
2. 将组织块用适量OCT黏至标本载台
3. 将组织切成5-20 微米厚度的切片 (通常是7微米, 厚度需视实验调整)
4. 用小毛笔带平切片, 并快速将冰冻组织切片贴附至已涂层(通常为Poly-L-Lysine)的温热载玻片上
5. 切片可置于-80°C存放6-12个月, 之后即可进行染色

C. 冰冻切片的荧光染色

1. 将有组织的冰冻切片从冰箱取出, 在室温放置10-20分钟
2. 以PBS润洗三次, 每次3分钟
3. 替代方案: 如果需要可进行抗原修复
注意: 许多抗原修复方法可能对冰冻切片太严苛, 抗原修复的替代方法须视实验调整
4. 用PAP免疫染色用疏水性阻隔笔在样品周围圈出一个封闭长方形(避免溶液流出)
5. 于玻片上加入封闭液, 室温封闭1小时
注意: 建议使用与二抗宿主来源相同的物种血清
6. 于玻片上加入以封闭液稀释的一抗, 在4°C孵育过夜
注意: 为避免玻片干掉, 孵育过夜时, 请将玻片置于密封且具湿度的染色盒中
7. 以PBS润洗三次, 每次5分钟
8. 加入封闭液稀释后的二抗, 于室温孵育1个小时
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
9. 以PBS润洗三次, 每次5分钟
10. 于载玻片滴上防淬灭Fluoroshield™ with DAPI (GTX30920)封片溶液, 盖上盖玻片
11. 核染色与封片的替代方案
 - 11-1 加入0.1-1 ug/ml Hoechst 33342或DAPI于玻片孵育5分钟
 - 11-2 以PBS润洗细胞两次
12. 以透明指甲油于玻片周围密封, 等待干燥



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系。

