

IF检测SOP

1.主要仪器

表1 实验所用主要仪器

所用仪器	仪器型号	公司
激光共聚焦显微镜成像系统	UltraVIEW VoX & IX81	Olympus
正置荧光显微镜	BX53	Olympus
生物安全柜	HFsafe-1500LC	Heal force
电子天平	PL-203	梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司
CO ₂ 培养箱	HFsafe-1200LC	HFsafe-1200LC
掌上离心机	Servicebio	D1008E
移液枪	Dragon	KE0003087/KA0056573

2.主要试剂耗材

表2 主要试剂及其生产公司

试剂名称	货号	生产公司
4%多聚甲醛固定液	E672002	生工
DAPI	D9542	sigma
Triton X-100	T8787	sigma
Alexa Fluor 594 – conjugated Goat Anti-Mouse IgG(H+L)	SA00006-3	三鹰生物
Alexa Fluor 594 – conjugated Goat Anti-Rabbit IgG(H+L)	SA00006-4	三鹰生物
Alexa Fluor 488 – conjugated Affinipure Goat Anti-Mouse IgG(H+L)	SA00006-1	三鹰生物
Alexa Fluor 488 – conjugated Affinipure Goat Anti-Rabbit IgG(H+L)	SA00006-2	三鹰生物
BSA	V900933	sigma
山羊血清	C0265	碧云天
载玻片	80302-2204	世泰
细胞爬片	801007	nest
96 孔板	3599	costar

3.实验内容

3.1 细胞爬片

- (1) 用盖片镊将盖玻片自75%乙醇中取出，用无菌丝绸布擦拭干净，不要用纱布；
- (2) 将盖玻片轻轻放入6孔培养板（每孔一片）；
- (3) 在距离紫外灯直射范围内20-30 厘米处照射2-3小时；
- (4) 将经过计数的细胞悬浮液移入培养板中，使盖玻片完全浸在培养液中；

(5) 将培养板在5% CO₂水浴孵箱中37°C孵育2-3天，当贴壁细胞生长至覆盖培养板底部2/3面积时，将培养板取出，即获得爬片。

3.2 细胞固定与孵抗

(1) 在培养板中将已爬好细胞的玻片用PBS浸洗3次，每次3min；

(2) 用4%的多聚甲醛固定爬片15min，PBS浸洗玻片3次，每次3min；

(3) 0.5%Triton X-100(PBS配制)室温通透20min（细胞膜上表达的抗原省略此步骤）；

(4) PBS浸洗玻片3次，每次3 min，吸水纸吸干PBS，在玻片上滴加正常山羊血清，室温封闭30min；

(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3min，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20-37°C孵育1h，PBST浸洗切片3次，每次3min；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。

(7) 复染核：滴加DAPI避光孵育5min，对标本进行染核，PBST 5min×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，然后在荧光显微镜下观察采集图像。

The end



• 一站式蛋白抗体发现服务

重组蛋白 · 抗体 · 噬菌体文库 · 诊断原料

武汉国家生物产业基地 · 光谷抗体发现与筛选公共服务平台