

## 免疫荧光操作步骤（石蜡切片）—间接法

### A. 所需溶液和试剂

1. 磷酸盐缓冲液 (C01-01001): 0.1M 1X PBS (PH7.4)
2. 固定液: 4%多聚甲醛溶液 (无甲醇) (C01-06002)
3. 抗体稀释液(C-0007): 1% BSA, 0.03% Proclin300 的 0.1M PBS
4. 抗原修复液 (C02-02001): 柠檬酸钠缓冲液
5. 封闭用正常山羊血清 (原液) (C-0005)
6. DAPI 染液 (C02-04002)
7. 免疫荧光抗淬灭封片剂 (C02-04003)

### B. 操作步骤

1. 60℃烤片 2 小时
2. 脱蜡。二甲苯脱蜡 15 分钟，三次
3. 水化。依次经过无水乙醇、95%、90%、80%、70%，各 5 分钟，蒸馏水（或自来水）5 分钟
4. PBS（洗液 C01-01001）洗 5 分钟，三次
5. 抗原修复。枸橼酸缓冲液（修复液，C02-02001）（约 92-95℃）煮沸（沸水浴）修复 15 分钟，自然凉至室温。PBS 洗 5 分钟，三次
6. 正常山羊血清（C-0005）封闭，37℃ 20 分钟
7. 一抗孵育，4℃过夜。（抗体稀释液 C-0007）
8. 复温 20 分钟，PBS 洗 5 分钟，三次
9. 二抗孵育，37℃下作用 1.5 小时（孵育抗体的浓度，作用时间通过预实验决定）。
10. PBS 洗 10 分钟，三次
11. DAPI 复染细胞核，1:1000 稀释，室温作用 5 分钟。

12. PBS 洗 5 分钟，三次
13. 防淬灭荧光封片剂封片，镜下观察。