

## 细胞免疫荧光操作步骤—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. 0.3%细胞穿膜剂 (C03-03002): 0.3% Triton X-100
5. 封闭用正常山羊血清 (原液) (C-0005)
6. DAPI 染液 (C02-04002)

### B. 操作步骤

1. 弃去细胞培养液, PBS 洗 3 次, 5 min/次。
2. 固定: 4%多聚甲醛室温固定 20 min, 也可 4℃固定过夜。
3. PBS 洗 3 次, 5 min/次。
4. 透膜: 0.3% Triton X -100 (C03-03002) 室温作用 20 min (如检测的蛋白为细胞膜蛋白, 可省略此步)。
5. PBS 洗 3 次, 5 min/次。
6. 封闭: 1:20 稀释山羊血清 (二抗来源血清) 室温封闭 20 min。
7. PBS 洗 3 次, 3 min/次。
8. 一抗 1:200 稀释, 37℃下作用 1.5 h (孵育抗体的浓度, 作用时间通过预实验决定)。
9. PBS 洗 3 次, 10 min/次。

- 10.二抗 1:300 稀释, 37°C 下作用 1 h (孵育抗体的浓度, 作用时间通过预实验决定) 。
- 11.PBS 洗 3 次, 10 min/次。
- 12.DAPI 复染细胞核, 1:1000 稀释, 室温作用 5 min。
- 13.PBS 洗 3 次, 5 min/次。
- 14.取出细胞爬片置于载玻片上, 镜下观察。