

# IF-Protocol

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 15min（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℃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，湿盒中室温孵育 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 5minx4 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。（及时观察可省略此步骤）

注意：荧光染色后一般在 1h 内完成观察，或于 4℃保存 4h，时间过长，可能会使荧光提前衰退。