

# 免疫荧光实验操作流程

## （石蜡切片）

### 一、实验仪器及试剂

#### 1、实验器材

微波炉、4℃冰箱、恒温恒湿箱、烘箱、移液器、避光孵育湿盒、抗原修复盒。

#### 2、实验试剂

① 缓冲液：0.01M pH7.2 TBS；0.01M pH7.2 TBST

试剂名称	1*TBS/L	试剂名称	1*TBST/L
Tris	1.21g	1*TBS	1L
NaCl	8.8g	Tween 20 溶液	0.001L
用稀 HCl 溶液和 NaOH 溶液调 pH 值		用稀 HCl 溶液和 NaOH 溶液调 pH 值	

② 修复液（可选）：0.01M pH9.0 Tris-EDTA 修复液；0.01M pH6.0 柠檬酸修复液

③ 封闭液：5%空白山羊血清

④ 二抗：

Alexa Fluor 594-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)# AS074;

Alexa Fluor 488-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)# AS073;

Alexa Fluor 594-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L)# AS077;

Alexa Fluor 488-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L)# AS076;

⑤ 染核试剂：1mg/mL DAPI（用时使用 dH<sub>2</sub>O 配制）

⑥ 去离子水（dH<sub>2</sub>O）、抗荧光衰减封片剂。

### 二、实验步骤

#### 1、水化/脱蜡：

（1）烤片：将石蜡切片按同一朝向放置在切片架上，将其放入 55℃ 的恒温箱中烤片 30 分钟；同时将脱蜡液 1 缸一起放入 55℃ 的恒温箱中；

（2）脱蜡至水：将石蜡切片连同切片架一起放入脱蜡液 1 缸中，再一起从恒温箱中取出置于常温，5 分钟后，将切片取出浸入到常温脱蜡液 2 缸中，并按照脱蜡液 2、脱蜡液 3、

无水乙醇 1、无水乙醇 2、无水乙醇 3 的顺序依次将石蜡切片放入缸中，每缸 5 分钟；用流水清洗切片 5 分钟。

注意：流水清洗时水流不能直接对着切片；操作过程中需一直保持切片处于湿润状态。

## 2、抗原修复：

将切片浸入盛有修复液（一般情况下用 0.01M pH9.0 Tris-EDTA 修复液）的修复盒中，将抗原修复盒盖斜盖在修复盒上；整体放入微波炉中，高火加热 3 分钟后停火，微波炉内静置 5 分钟；再高火加热 3 分钟后停火，微波炉内静置 5 分钟；随后中低火加热 1 分钟后停火，微波炉内静置 5 分钟，然后将切片连同抗原修复盒拿出缓慢冷却至室温。

注意：修复液需完全浸没切片上组织；修复过程中严禁打开微波炉门；修复完成后不可快速冷却；修复液可根据实验需求自行换用 0.01M pH6.0 柠檬酸修复液。

## 3、染色：

（1）封闭：用 5%空白山羊血清将样本完全覆盖，切片需放置于湿盒内，置于 37℃ 恒温恒湿培养箱孵育 30min；

（2）一抗孵育：去除封闭液，直接在样本上滴加 TBS 缓冲液配制的一抗工作液，样本需完全覆盖，切片需放置于湿盒内，置于 4℃ 孵育过夜；

（3）复温：将样本置于常温，复温 15min，去除抗体工作液，用缓冲液 TBST 洗涤 1 次，5 分钟；用缓冲液 TBS 洗涤 3 次，每次 5 分钟；

（4）二抗孵育：在样本上滴加与一抗种属对应的荧光二抗工作液，样本需完全覆盖，避光，37℃，孵育 1 小时；去除二抗工作液，用缓冲液 TBST 洗涤 1 次，5 分钟；用缓冲液 TBS 洗涤 3 次，每次 5 分钟；

（5）染核：在样本上滴加 DAPI 工作液，使用 dH<sub>2</sub>O 配制，DAPI 溶液：dH<sub>2</sub>O 体积比 1:500，避光，室温，孵育 10 分钟；去除 DAPI 工作液，用缓冲液 TBST 洗涤 1 次，5 分钟；用缓冲液 TBS 洗涤 3 次，每次 5 分钟；

（6）滴加抗荧光衰减封片剂，然后加盖盖玻片封片，再于荧光显微镜下观察并采集图像。

注意：实验中，所有试剂滴加应准确、快速、足量，不能出现干片的情况；染色步骤从二抗孵育开始，后续所有步骤都需注意避光操作；染色完成后需及时观察并采集图像，避免干燥和荧光物质淬灭。