



细胞爬片荧光单标染色实验报告

1. 实验器材及试剂

1.1 实验器材

名称	厂家	型号
载玻片	上海希柏徕生物科技有限公司	G6012
盖玻片	江苏世泰实验器材有限公司	10212432C
脱色摇床	上海希柏徕生物科技有限公司	DS-2S100
涡旋混合器	上海希柏徕生物科技有限公司	MV-100
掌上离心机	上海希柏徕生物科技有限公司	MS6000
移液枪	上海希柏徕生物科技有限公司	
组化笔	上海希柏徕生物科技有限公司	G6100
正置荧光显微镜	日本尼康	NIKON ECLIPSE C1
扫描仪	3DHISTECH	Pannoramic MIDI

1.2 主要实验试剂

试剂	厂家	货号
PBS 缓冲液	上海希柏徕生物科技有限公司	G0002
破膜液	上海希柏徕生物科技有限公司	G1204
牛血清白蛋白 BSA	上海希柏徕生物科技有限公司	GC305010
DAPI 染色试剂	上海希柏徕生物科技有限公司	G1012
抗荧光淬灭封片剂	上海希柏徕生物科技有限公司	G1401

1.3 抗体信息及修复条件

抗原修复条件	一抗名称	一抗货号	一抗厂家	一抗种属	一抗稀释比	对应的二抗名称

(备注: 抗体加样顺序按照抗体书写顺序, 二抗货号, 厂家及稀释比见下方附表)

2. 实验步骤

2.1 细胞破膜: 爬片稍甩干后用组化笔在盖玻片中间细胞分布均匀的位置画圈 (防止抗体流走), 加 50-100 μ l 破膜工作液, 室温孵育 20min, PBS 洗 3 次, 每次 5 min。 (如果是膜蛋白染色, 则不做破膜处理)

2.2 血清封闭: 在圈内滴加用 3%BSA 均匀覆盖组织, 室温封闭 30min。 (一抗是山羊来源用 10%驴血清封闭, 一抗其它来源的用 3%BSA 封闭)

2.3 加一抗: 轻轻甩掉封闭液, 在细胞孔板里滴加 PBS 按一定比例配好的一抗, 细胞培养板平放于湿盒内 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。

2.4 加二抗: 细胞孔板置于脱色摇床上晃动洗涤 3 次, 每次 5min。加对应二抗, 室温孵育





50min。

2.5 DAPI 复染细胞核：爬片置于 PBS（PH7.4）中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次，每次 5min。切片稍甩干后在圈内滴加 DAPI 染液，避光室温孵育 10min。

2.6 封片：爬片置于 PBS（PH7.4）中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次，每次 5min。玻片稍甩干后用抗荧光淬灭封片剂封片。

2.7 采集图像：DAPI 激发波长 330-380nm，发射波长 420nm；488 激发波长 465-495nm，发射波长 515-555 nm；CY3 激发波长 510-560 nm，发射波长 590nm；CY5 激发波长 608-648nm，发射波长 672-712 nm。

3. 结果判读

DAPI 通道细胞核为蓝色，488 通道阳性为绿色，CY3 通道阳性为红色，CY5 通道阳性为黄色。





附表

二抗及 TSA 名称	货号	厂家	稀释比
CY3 标记山羊抗兔 IgG	GB21303	XBL	1:300
CY3 标记山羊抗小鼠 IgG	GB21301	XBL	1:300
CY3 标记山羊抗大鼠 IgG	GB21302	XBL	1:300
CY3 标记驴抗山羊 IgG	GB21404	XBL	1:300
CY3 标记驴抗小鼠 IgG	GB21401	XBL	1:300
CY3 标记驴抗兔 IgG	GB21403	XBL	1:300
Alexa Fluor 488 标记山羊抗兔 IgG	GB25303	XBL	1:400
Alexa Fluor 488 标记山羊抗小鼠 IgG	GB25301	XBL	1:400
CY5 标记山羊抗小鼠 IgG	GB27301	XBL	1:400
CY5 标记山羊抗兔 IgG	GB27303	XBL	1:400
HRP 标记兔抗山羊 IgG	GB23204	XBL	1:500
HRP 标记山羊抗小鼠 IgG	GB23301	XBL	1:500
HRP 标记山羊抗大鼠 IgG	GB23302	XBL	1:500
HRP 标记山羊抗兔 IgG	GB23303	XBL	1:500
HRP 标记驴抗山羊 IgG	GB23404	XBL	1:500
FITC 标记驴抗山羊 IgG	GB22404	XBL	1:200
FITC 标记山羊抗大鼠 IgG	GB22302	XBL	1:200
FITC 标记驴抗兔 IgG	GB22403	XBL	1:200
FITC 标记驴抗小鼠 IgG	GB22401	XBL	1:200
Alexa Fluor 594 标记山羊抗兔 IgG	111-585-003	Jackson	1:400
Alexa Fluor 594 标记山羊抗小鼠 IgG	115-585-003	Jackson	1:400
iF440-Tyramide	G1250	XBL	1:500
iF488-Tyramide	G1231	XBL	1:500
iF546-Tyramide	G1251	XBL	1:500
iF555-Tyramide	G1233	XBL	1:500
iF594-Tyramide	G1242	XBL	1:500
iF647-Tyramide	G1232	XBL	1:500
iF700-Tyramide	G1252	XBL	1:800
iF750-Tyramide	G1258	XBL	1:500

仅供科研用途，不可用于临床诊断！



希柏徠生物致力于组织原位多标分析技术，光谱成像，自动化采集及智能分析的全套解决方案！

地址:上海市奉贤区平庄西路1599号
电话:18062456473/18621529881

邮箱:maliwenlin@163.com
微信:XBL-FuHao