

产品信息

| 产品编号 | 产品名称 | 50 Assays | 100 Assays | 200 Assays | Storage |
|-----------|---|-------------|-------------|------------------------|------------------|
| E-AB-1011 | Goat Anti-Mouse IgG(H+L)(Cyanine3 conjugated) | 120 μ L | 200 μ L | 200 μ L \times 2 | -20 $^{\circ}$ C |
| E-IR-R110 | Normal Goat Blocking Buffer (Ready-to-Use) | 5 mL | 10 mL | 20 mL | 2~8 $^{\circ}$ C |
| E-IR-R103 | DAPI Reagent (1 μ g/mL) | 5 mL | 10 mL | 20 mL | 2~8 $^{\circ}$ C |
| E-IR-R119 | Anti-Fluorescence Quenching Agent | 5 mL | 10 mL | 20 mL | 2~8 $^{\circ}$ C |

说明书

一份

产品简介

免疫荧光染色试剂盒(Immunol Fluorence Staining Kit)系列是 DIA•AN[®]开发的用于细胞或组织切片检测免疫荧光染色的试剂盒。在有适当的一抗检测特定的目标蛋白时,就可以使用免疫荧光染色试剂盒检测到红色、绿色或蓝色等荧光。

免疫荧光染色试剂盒-抗小鼠 Cyanine3(Immunol Fluorescence Staining Kit(Anti-Mouse IgG-Cyanine3)),含有 Cyanine3 标记的山羊抗小鼠 IgG(H+L)抗体,可以用于检测小鼠来源的一抗,观察到的颜色为非常鲜艳的红色。Cyanine3 是近年新开发的一种红色荧光探针。它比绝大部分其它的红色荧光探针更加明亮,更加不容易淬灭,而且背景更低。

本试剂盒含有抗荧光淬灭封片液,可以使荧光更加持久。

实验操作指南步骤

1. 免疫荧光染色的准备工作

A. 固定液的准备:

推荐使用 4%多聚甲醛作为固定液(E-IR-R113),或根据特定的一抗或样品采用有效成分为乙醇、甲醇或其它类型的固定液。

B. 通透液工作液准备:

使用 Triton X-100 作为通透液(E-IR-R122),用 1x PBS buffer 稀释成 0.5% Triton X-100 工作液。

C. PBST 工作液的准备:

推荐使用 PBST 作为洗涤液,可使用 DIA•AN[®] 10 \times PBST E-IR-R310,按照 1:9 的比例用去离子水稀释至 1 \times 的 PBST 工作液。

D. 一抗稀释液的准备:

推荐使用 DIA•AN[®]的抗体稀释液(E-IR-R106),也可选用 3%BSA 的 PBS 或者 PBS 作为一抗稀释液。

E. 一抗的稀释:

按照一抗说明书中推荐的用于免疫荧光染色的稀释比例用一抗稀释液稀释一抗。

F. 荧光标记二抗的稀释:

推荐使用 DIA•AN[®]的抗体稀释液(E-IR-R106),按照 1:50 的比例用将本试剂盒中的免疫荧光染色二抗稀释成工作液,也可选用 3%BSA 的 PBS 或者 PBS 作为抗体稀释液。根据荧光的强弱,稀释的比例可以适当提高或降低。

For Research Use Only

2. 对于贴壁细胞

- A. 取普通洁净盖玻片于 70%乙醇中浸泡 5 分钟或更长时间, 无菌超净台内吹干或用细胞培养级 PBS 或 0.9% NaCl 等溶液洗涤三遍, 再用细胞培养液洗涤一遍。将盖玻片置于六孔板内, 种入细胞培养过夜, 使约为 50%~80%满。
- B. 按照特定的实验目的处理细胞后, 吸尽培养液, 加入 1 mL 固定液, 室温固定 15-30 分钟或更长时间。
- C. 去固定液, 用 PBST 工作液洗 3 次, 每次 3~5 分钟, 吸尽液体。洗涤时宜用摇床, 或手动晃动数次。
- D. 使用 0.5% Triton X-100 室温通透细胞 15 分钟 (细胞膜上表达的抗原可省略此步骤), 1×PBST 浸洗玻片 3 次, 每次 3 分钟。
- E. 用本试剂盒中的正常山羊血清封闭液(E-IR-R110)封闭 30 分钟, 可以在摇床上轻轻摇动。
- F. 去除封闭液, 用稀释的特定一抗湿盒内 37°C 避光孵育 60 分钟, 可以在摇床上轻轻摇动。为增强与一抗的结合, 可以 4°C 孵育过夜。
- G. 去除一抗, 用 PBST 工作液洗涤 3~5 次, 每次 3~5 分钟。每次洗涤时都可以在摇床上轻轻摇动。
- H. 去除 PBST 工作液, 在盖玻片上加入 100 μ L 稀释好的荧光标记的二抗湿盒内 37°C 避光孵育 60 分钟。
- I. PBST 工作液洗涤 3~5 次, 每次 3~5 分钟, 期间适当注意避光操作。
- J. 复染核: 滴加本试剂盒中的 DAPI 染色液(E-IR-R103)避光孵育 5 分钟, 对标本进行染核, PBST 工作液洗涤玻片 5 分钟, 洗涤 4 次去除多余的 DAPI 染色液。
- K. 滴一滴本试剂盒提供的抗荧光淬灭封片液(E-IR-R119)于载玻片上, 盖上贴有细胞的盖玻片, 尽量避免气泡。使细胞接触封片液, 切勿弄反。
- L. 如果一抗选用适当, 在荧光显微镜下可以观察到红色的荧光。

3. 对于悬浮细胞

- A. 离心收集细胞样品于 1.5 mL 离心管内, 吸除上清后轻轻弹散细胞。
- B. 加入 0.5 mL 固定液, 缓缓悬起细胞, 室温固定 15-30 分钟或更长时间。
- C. 离心去固定液, 用 PBST 工作液洗 3 次, 每次 3~5 分钟。洗涤期间可以用手或摇床轻轻晃动。
- D. 最后一次离心后吸去大部分液体保留约 50 μ L 液体, 再缓缓悬起细胞, 滴加至载玻片上, 尽量使细胞分布均匀。
- E. 稍晾干, 使细胞贴在载玻片上不易随液体流动。如果条件许可, 可以使用适当的离心机, 通过离心把细胞贴紧在载玻片上。
- F. 使用 0.5% Triton X-100 室温通透细胞 15 分钟 (细胞膜上表达的抗原可省略此步骤), 1×PBS 浸洗玻片 3 次, 每次 3 分钟。
- G. 用本试剂盒中的正常山羊血清封闭液(E-IR-R110)封闭 30 分钟。
- H. 去封闭液, 用稀释的特定一抗湿盒内 37°C 避光孵育 60 分钟。为增强与一抗的结合, 可以 4°C 孵育过夜。
- I. 去除一抗, 用 PBST 工作液洗涤 3~5 次, 每次 3~5 分钟。
- J. 去除 PBST 工作液, 加入 100 μ L 稀释好的荧光标记的二抗湿盒内 37°C 避光孵育 60 分钟。
- K. PBST 工作液洗涤 3~5 次, 每次 3~5 分钟, 期间适当注意避光操作。
- L. 复染核: 滴加本试剂盒中的 DAPI 染色液(E-IR-R103)避光孵育 5 分钟, 对标本进行染核, PBST 工作液洗涤玻片 5 分钟, 洗涤 4 次去除多余的 DAPI 染色液。
- M. 滴一滴本试剂盒提供的抗荧光淬灭封片液(E-IR-R119)于载玻片上, 盖上盖玻片, 尽量避免气泡。
- N. 如果一抗选用适当, 在荧光显微镜下可以观察到红色的荧光。

For Research Use Only

4. 对于组织切片

- ① 对于石蜡切片，需先完成脱蜡、水化和抗原修复。
- ② 对于冰冻切片可以直接按照下面的步骤操作：
 - a: 用固定液室温固定15-30分钟或更长时间。
 - b: 去固定液，用PBST工作液洗3次，每次3~5分钟，吸尽液体。洗涤时宜用摇床，或手动晃动数次。
 - c: 使用0.5% Triton X-100室温通透细胞15分钟（细胞膜上表达的抗原可省略此步骤），1×PBST浸洗玻片3次，每次3分钟。
- A. 用本试剂盒中的正常山羊血清封闭液（E-IR-R110）封闭30分钟，可以在摇床上轻轻摇动。
- B. 去除封闭液，用稀释的特定一抗湿盒内37℃孵育60分钟，可以在摇床上轻轻摇动。为增强与一抗的结合，可以4℃作用过夜。
- C. 去除一抗，用PBST工作液洗涤3~5次，每次3~5分钟。每次洗涤时都可以在摇床上轻轻摇动。
- D. 去除PBST工作液，加入100 μL稀释好的荧光标记的二抗湿盒内37℃避光孵育60分钟。
- E. PBST工作液洗涤3~5次，每次3~5分钟，期间适当注意避光操作。每次洗涤时都可以在摇床上轻轻摇动。
- F. 复染核：滴加本试剂盒中的DAPI染色液（E-IR-R103）避光孵育5分钟，对本标本进行染核，PBST工作液洗涤玻片5分钟，洗涤4次去除多余的DAPI染色液。
- G. 滴一滴本试剂盒提供的抗荧光淬灭封片液（E-IR-R119）于载玻片上，盖上盖玻片，尽量避免气泡。
- H. 如果一抗选用适当，在荧光显微镜下可以观察到红色的荧光。

保存条件

2~8℃/-20℃ 分开保存，有效期12个月。同时荧光二抗（E-AB-1011）和 DAPI（E-IR-R103）染色液需避光保存。

注意事项

1. 需荧光显微镜或激光共聚焦显微镜。
2. 在使用抗荧光淬灭封片液的情况下可以减缓淬灭，但仍宜尽量避光，特别是需要尽量缩短在荧光显微镜下的观察时间。
3. 荧光物质均易发生淬灭，染色后宜尽快进行荧光显微镜下的观察。如果不能及时观察可以4℃避光保存，但存放时间通常不宜超过一周，随着存放时间的延长可能会导致观察效果越来越差。
4. 免疫荧光染色效果的好坏和一抗的关系非常密切。建议选购有较多文献报道的并注明可以用于免疫荧光染色的一抗用于本实验。
5. 如果观察时发现荧光过弱，可以适当提高一抗的浓度；如果荧光还是比较弱，可以适当提高荧光标记抗体的浓度。
6. 需自行配制用于免疫荧光染色的相关试剂，需自备盖玻片和载玻片。
7. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
8. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

For Research Use Only