细 胞 免 疫 荧 光

1) 取出爬片/涂片， PBS 清洗 2~3 次；

2)固定： 将爬片用 4%多聚甲醛（AWI0056） 固定 30min；

3)洗涤： PBS 冲洗 5 min x 3 次；

4) 通透：加入用 PBS 稀释的 0.2%-0.5% Triton X-100（AWI0603），室温静置 5-15min，在细胞膜上打孔，便于抗体进入细胞内与抗原结合。PBS 冲洗 3 min x 3 次；

（注意：如果检测的目标抗原仅位于细胞膜表面，此步可省略）

5) 封闭：加入含 5% BSA 或与二抗同源血清（AWI0115）的封闭液，室温孵育 30-60min，以封闭非特异性结合位点，降低背景染色。
（操作提示：此步结束后，通常吸去封闭液即可，不用洗涤）

6) 孵育一抗：滴加适当稀释的一抗（例如 SIRT3；AWA10553），确保完全覆盖细胞。置于湿盒中，4℃孵育过夜或 37℃孵育 1-2h。（ 4℃过夜通常有助于获得更高的特异性）。PBS 冲洗 5 min x 3 次；

7) 孵育二抗：滴加 50~100ul 抗-Rabbit-IgG 标记荧光抗体（Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor 488；AWS0003），37℃孵育 90 min，PBS 冲洗 5 min x 3 次；

（注意：从此步开始，直至实验结束，所有操作均需严格避光，防止荧光淬灭）

8) 染核：DAPI 工作液（AWC0293）37℃染核 10 min，以标记细胞核位置，便于镜下寻找细胞和观察细胞形态。 PBS 冲洗 5 min x 3 次；

9)封片：在洁净载玻片上滴加一小滴抗荧光淬灭封片剂（AWI0197）。用镊子小心取出细胞爬片，吸去边缘多余液体，将有细胞的一面朝下，缓慢盖在封片剂上，避免产生气泡。可用透明指甲油涂抹盖玻片边缘进行固定和密封。

10) 观察拍照：到荧光显微镜下观察或避光保存。