通用型免疫荧光（IF）工具箱（抗兔 Dylight 594）

Cat #: KTD109-CN Size: 100 T

	通用型免疫荧光（IF）工具箱（抗兔 Dylight 594）		
REF	**货号：**KTD109-CN	LOT	**批号：**见产品标签
	应用：组织、细胞样本的免疫荧光检测		
	保质期：-20℃避光保存 12 个月		

原理

免疫荧光技术（IF）是根据抗原抗体反应的原理，先将已知的抗原或抗体标记上荧光素，制成荧光抗体，再用这种荧光抗体（或抗原）作为探针检测组织或细胞内的相应抗原（或抗体）。基于传统的 IF 实验操作繁琐耗时、试剂用品种类繁多、实验结果稳定性可靠性差的痛点，Abbkine 开发出通用型免疫荧光（IF）工具箱，经精心设计钻研，该工具箱包含：①操作便捷，组分齐全，无需操心复杂试剂，开盒即可开始实验；②提供优化的抗体稀释液和 SuperKine™ 增强型抗荧光淬灭剂，抗淬灭效果强，维持极佳的荧光强度；③提供 Dylight 系列二抗，具有更强的荧光强度和更高的光学耐受性及特异性；④含有 Dylight 594 标记的山羊抗兔抗体，可以用于检测兔来源的相应一抗，观察到的颜色为明亮红色。

包装清单

试剂盒组分	规格（100 T）	储存条件
Immunostaining Permeabilization Buffer	100 mL	4℃
EDTA Antigen Retrieval Solution pH 8.0 (20×)	100 mL	4℃
PBS (20×)	100 mL	4℃
Goat Serum Blocking Buffer	20 mL	-20℃
Antibody Wash Buffer (20×)	25 mL	4℃
Antibody Dilution Buffer	50 mL	4℃
DyLight 594, Goat Anti-Rabbit IgG	100 μL	-20℃避光
DAPI (500×)	100 μL	-20℃避光
SuperKine™ Enhanced Antifade Mounting Medium	10 mL	-20℃避光

自备耗材

- 固定液（4%多聚甲醛）
- 一抗，荧光显微镜，组化笔
- 去离子水，载玻片，湿盒

Not for further distribution without written consent.Copyright © Abbkine, Inc.

试剂准备

Immunostaining Permeabilization Buffer：即用型；4℃保存。

EDTA Antigen Retrieval Solution pH 8.0：临用前配制，用去离子水将 EDTA Antigen Retrieval Solution pH 8.0 (20×)稀释 10 倍得到 EDTA Antigen Retrieval Solution pH 8.0，4℃保存。

PBS：临用前配制，用去离子水将 PBS (20×)稀释 20 倍得到 PBS，4℃保存。

Goat Serum Blocking Buffer：即用型；使用前平衡至室温，-20℃保存。

Antibody Wash Buffer：临用前配制；用去离子水将 Antibody Wash Buffer (20×)稀释 20 倍得到 Antibody Wash Buffer；4℃保存。

Antibody Dilution Buffer：即用型；用于稀释一抗和二抗；4℃保存。

DyLight 594, Goat Anti-Rabbit IgG：山羊抗兔 IgG 二抗，红色 DyLight 594 荧光标记；推荐稀释比例 1:200。

1×DAPI Staining Solution：临用前配制，用 PBS 将 DAPI (500×)稀释 500 倍得到 1×DAPI Staining Solution。

SuperKine™ Enhanced Antifade Mounting Medium：即用型；-20℃避光保存。

实验步骤

A. 对于石蜡切片

1．脱蜡至水化：依次将切片放入二甲苯Ⅰ15 min，二甲苯Ⅱ15 min，无水乙醇Ⅰ5 min，无水乙醇Ⅱ5 min，85%酒精 5 min，75%酒精 5 min，去离子水洗。

2．抗原修复：切片置于盛满 EDTA Antigen Retrieval Solution pH 8.0 (1×)的修复盒中于微波炉内进行抗原修复。中火 8 min，停火 8 min，转中低火 7 min，此过程中应防止缓冲液过度蒸发，切勿干片。自然冷却后将切片置于 PBS 中在摇床上洗 3 次，每次 3 min。

注意：修复液和修复条件根据组织来确定，最佳加热时间需根据不同的样品和目的蛋白自行摸索。

3．画圈：切片稍甩干后，用组化笔在组织周围画圈（防止抗体流走）。

4．封闭：在圈内滴加一滴 Goat Serum Blocking Buffer，室温孵育 30 min。

5．一抗：轻甩 Goat Serum Blocking Buffer，在圈内滴加用 Antibody Dilution Buffer 稀释好的一抗，于湿盒内室温孵育 1 h 或 4℃孵育过夜（湿盒内加少量水防止抗体蒸发）。

注意：荧光共定位检测可先孵育完第一种一抗，洗弃非特异性结合的抗体后，换另一种一抗进行第二轮孵育。

6．荧光二抗：切片置于 Antibody Wash Buffer 中，置于摇床上清洗 2 次，每次 5 min，再置于 PBS 中，摇床上清洗 1 次，5 min。切片稍甩干后，在圈内滴加 Antibody Dilution Buffer 稀释好的二抗，避光室温孵育 1 h。

注意：加荧光二抗后，后续所有操作步骤都应在暗处进行。荧光共定位检测可孵育完对应的第一种二抗，洗去非特异性结合的抗体后，换另一种对应的二抗进行第二轮孵育。

7．DAPI 复染：切片置于 Antibody Wash Buffer 中，置于摇床上清洗 2 次，每次 5 min，再置于 PBS 中，摇床上清洗 1 次，5 min。在圈内滴加 1×DAPI Staining Solution，避光孵育 5-10 min，吸弃未反应的 1×DAPI Staining Solution，PBS 洗 3 次，每次 5 min。

8．封片：用吸水纸吸干切片上的液体，用 SuperKine™ Enhanced Antifade Mounting Medium 封片，尽量避免气泡，荧光显微镜观察。

B. 对于血涂片、冰冻切片和细胞爬片

1．固定：载玻片用防脱片剂处理（Poly-L-Lysine），抗凝血经离心分层后涂片；冰冻切片室温风扇吹干；细胞爬片生长。以 24 孔板细胞爬片为例，吸尽培养液，加入 1 mL 固定液，室温固定 15-30 min，吸弃固定液，PBS 洗 3 次，每次 3 min。

注意：推荐使用 4%多聚甲醛作为固定液，也可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。

2．破膜：加入 1 mL Immunostaining Permeabilization Buffer 室温孵育 20 min，吸弃未反应的 Immunostaining Permeabilization Buffer，PBS 清洗 3 次，每次 3 min。

注意：冰冻切片也可选用含 20 μg/mL 蛋白酶 K 的 PBS 溶液，消化 15 min。

3．封闭：吸弃 PBS，加入 200 μL Goat Serum Blocking Buffer，室温孵育 30 min。

4．一抗：吸弃 Goat Serum Blocking Buffer，加入 200 μL 用 Antibody Dilution Buffer 稀释好的一抗，于湿盒内，室温孵育 1 h 或内 4℃孵育过夜（湿盒内加少量水防止抗体蒸发）。

注意：荧光共定位检测可孵育完第一种一抗，洗弃非特异性结合的抗体后，换另一种一抗进行第二轮孵育。

5．荧光二抗：吸弃一抗，加入 1 mL Antibody Wash Buffer，置于摇床上清洗 3 次，每次 5 min，再加入 1 mL PBS，置于摇床上清洗 1 次，5 min。吸弃 PBS，加入 200 μL 用 Antibody Dilution Buffer 稀释好的二抗，避光室温孵育 1 h。

Not for further distribution without written consent.Copyright © Abbkine, Inc.

注意：加荧光二抗起，后续所有操作步骤都应在较暗处进行。荧光共定位检测可孵育完对应的第一种二抗，洗去非特异性结合的抗体后，换下一种对应的二抗进行第二轮孵育。

6．DAPI 复染：吸弃二抗，加入 1 mL Antibody Wash Buffer 在摇床上洗 2 次，每次 5 min，再加入 1 mL PBS 在摇床上洗 1 次，5 min。吸弃 PBS，加入 500 μL DAPI Staining Solution 避光孵育 5-10min，吸弃 DAPI Staining Solution，PBS 洗 3 次，每次 5 min。

7．封片：滴一滴 SuperKine™ Enhanced Antifade Mounting Medium 于载玻片上，盖上贴有细胞的盖玻片，让细胞接触封片液，尽量避免气泡，荧光显微镜观察。

C. 对于非贴壁细胞

1．收集细胞：300 g 离心 5 min，收集细胞，吸弃上清后轻轻弹散细胞。

2．固定：加入 0.5 mL 固定液，轻柔悬浮细胞，室温固定 15-30 min，300 g 离心 5 min，吸弃固定液，PBS 清洗 3 次，每次 3 min。

3．破膜：加入 0.5 mL Immunostaining Permeabilization Buffer，轻柔悬浮细胞，室温孵育 20 min，300 g 离心 5 min，吸弃 Immunostaining Permeabilization Buffer，PBS 清洗 3 次，每次 5 min。

4．封闭：300 g 离心 5 min，吸弃 PBS，用 100 μL Goat Serum Blocking Buffer 悬浮细胞，室温封闭 30 min。

5．一抗：300 g 离心 5 min，吸弃 Goat Serum Blocking Buffer，用 100 μL Antibody Dilution Buffer 稀释好的一抗重悬细胞，室温孵育 1 h 或 4℃孵育过夜（推荐使用垂直混匀仪）。

注意：荧光共定位检测可孵育完第一种一抗，洗弃非特异性结合的抗体后，换另一种一抗进行第二轮孵育。

6．二抗：300 g 离心 5 min，吸弃一抗，加入 0.5 mL Antibody Wash Buffer，清洗 3 次，每次 5 min，再加入 0.5 mL PBS，清洗 1 次，5 min。300 g 离心 5 min，吸弃 PBS，加入 100 μL Antibody Dilution Buffer 稀释好的二抗重悬细胞，避光室温孵育 1 h。

注意：加荧光二抗起，后续所有操作步骤都应在较暗处进行。荧光共定位检测可孵育完对应的第一种二抗，洗弃非特异性结合的抗体后，换另一种对应的二抗进行第二轮孵育。

7．DAPI 复染：300 g 离心 5 min，吸弃二抗，加入 0.5 mL Antibody Wash Buffer，清洗 3 次，每次 5 min，再加入 0.5 mL PBS，清洗 1 次，5 min。300 g 离心 5 min，吸弃 PBS，加入 200 μL 1×DAPI Staining Solution 重悬细胞，避光孵育 5-10 min，离心吸弃 1×DAPI Staining Solution，PBS 洗 3 次，每次 5 min。

8．封片：300 g 离心 5 min，吸弃大部分 PBS，保留约 50 μL 液体，轻柔悬浮细胞，滴加至载玻片上，尽量使细胞均匀分布，稍晾干后，滴一滴 SuperKine™ Enhanced Antifade Mounting Medium 封片，尽量避免气泡，荧光显微镜观察。

草莓时刻：通用型免疫荧光（IF）工具箱是 Abbkine 开发的用于免疫荧光染色的多功能型工具箱，极具便利性与实用性，可快速开展 IF 实验，获得高清炫彩成像图片。扫描右侧二维码，关注 Abbkine 公众号，了解更多 Abbkine 产品信息。

相关产品

货号	品名	推荐原因
KTD107-CN	通用型免疫荧光（IF）工具箱（抗兔 Dylight 488）	明亮绿色荧光，专为一站式 IF 实验设计
KTD108-CN	通用型免疫荧光（IF）工具箱（抗小鼠 Dylight 488）	明亮绿色荧光，专为一站式 IF 实验设计
KTD110-CN	通用型免疫荧光（IF）工具箱（抗小鼠 Dylight 594）	鲜艳红色荧光，专为一站式 IF 实验设计
A23210	山羊抗小鼠 IgG 二抗，绿色 DyLight 488 荧光标记	更高的特异性，极低背景，不可或缺的荧光二抗
A23220	山羊抗兔 IgG 二抗，绿色 DyLight 488 荧光标记	更高的特异性，极低背景，不可或缺的荧光二抗
A23410	山羊抗小鼠 IgG 二抗，橙红色 DyLight 594 荧光标记	更高的特异性，极低背景，不可或缺的荧光二抗
A23420	山羊抗兔 IgG 二抗，橙红色 DyLight 594 荧光标记	更高的特异性，极低背景，不可或缺的荧光二抗

免责声明

本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

Not for further distribution without written consent.Copyright © Abbkine, Inc.