

碧云天免疫荧光技术服务

Immunofluorescence by Beyotime



碧云天
Beyotime



碧云天网站



微信公众号

碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology
订购热线：400-168-3301或800-8283301
技术咨询：info@beyotime.com
技术服务：service@beyotime.com
网址：<http://www.beyotime.com>

碧云天免疫荧光技术服务

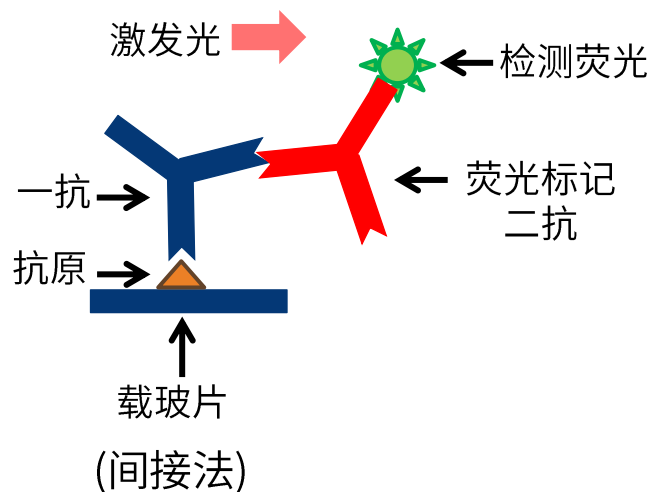
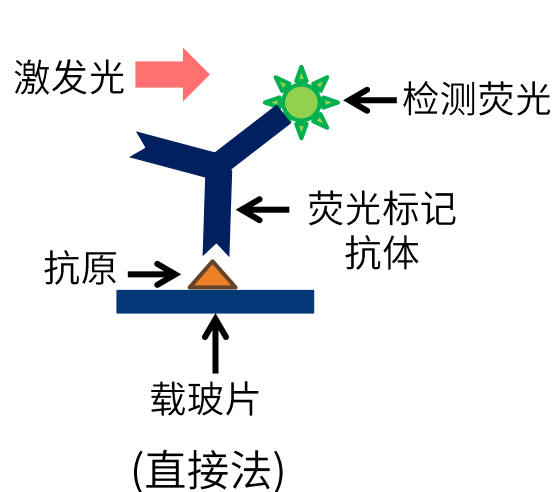
概述

- 免疫荧光(Immunofluorescence, IF)是一项建立在免疫学、生物化学和显微镜技术基础上的实验技术，依据抗原、抗体的反应原理进行组织或细胞内抗原物质的定位，是近代免疫学的一种重要研究手段。
- 免疫荧光技术有两种检测方法：用荧光抗体示踪或检查相应抗原的方法称荧光抗体法；用已知的荧光抗原标记物示踪或检查相应抗体的方法称荧光抗原法。以荧光抗体方法较常用。

碧云天免疫荧光技术服务

原理

- 免疫荧光是根据抗原、抗体结合原理，先将已知的抗原或抗体标记上荧光素制成荧光标记物，再用这种荧光抗体(或抗原)作为分子探针检测细胞或组织内的相应抗原(或抗体)。在细胞或组织中形成的抗原抗体复合物上含有荧光素，利用荧光显微镜观察样本，荧光素受激发光的照射而发出明亮的荧光(黄绿色或桔红色)，由此可以观察荧光所在的细胞或组织，从而对抗原或抗体的进行定性、定位，以及利用定量技术进行定量。



碧云天免疫荧光技术服务

碧云天的优势

- ◆ **金品质：** 碧云天凭借多年的生物研发经验，提供高灵敏度、高特异性的免疫荧光实验相关试剂；
- ◆ **高质量：** 碧云天的技术服务人员拥有精湛的技术和丰富的经验，保质保量的完成客户实验；
- ◆ **服务全：** 碧云天拥有先进的实验设备，完善的实验条件，客户可根据实验需求灵活选择服务项目；
- ◆ **价格低：** 碧云天以最优惠的价格为客户提供最全面的服务，帮助客户有效节约科研经费；
- ◆ **时间短：** 碧云天拥有全套检测设备和专业实验平台，在最短的时间内为客户提供服务。

碧云天免疫荧光技术服务

分类

➤ 经典的荧光抗体技术包括：

◆ 直接法

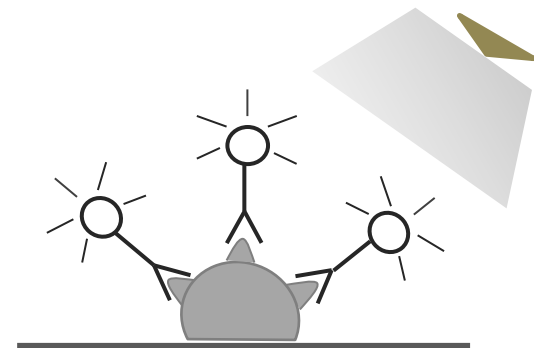
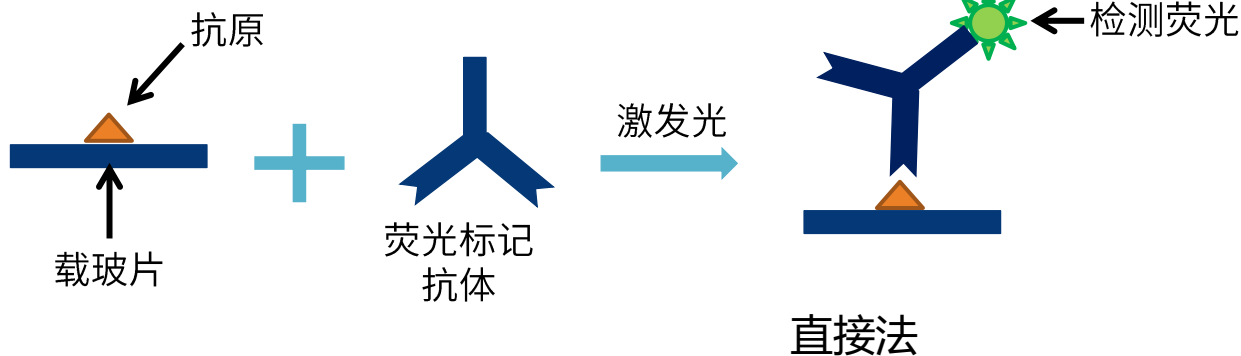
- ✓ 用于检测抗原。荧光素标记的特异性抗体直接与相应抗原反应。

◆ 间接法

- ✓ 特异性抗体与相应抗原反应，荧光素标记的抗体再与一抗结合。

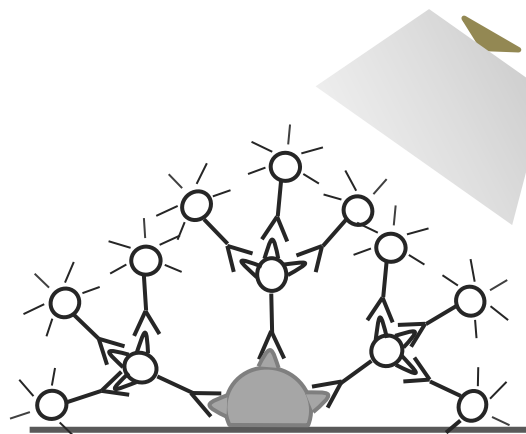
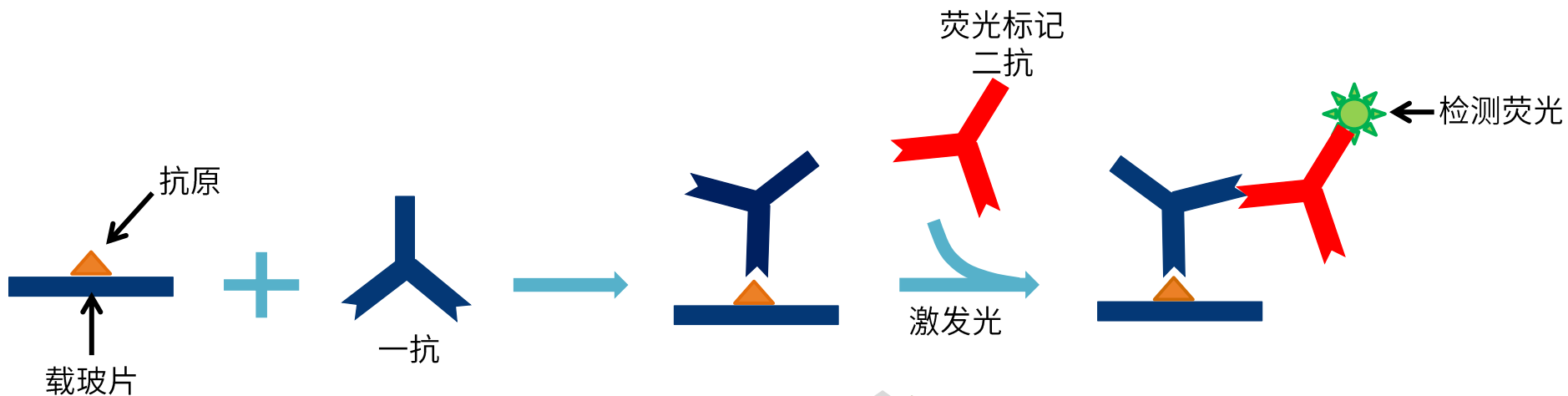
◆ 补体法

- ✓ 间接法的一种改良。抗原抗体结合后可与补体结合。



碧云天免疫荧光技术服务

分类



间接法

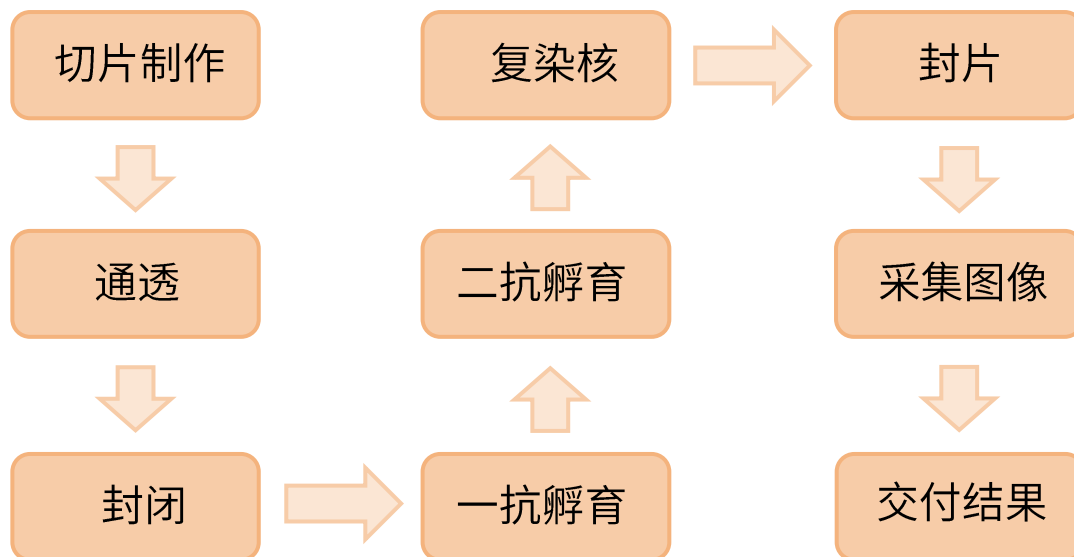
碧云天免疫荧光技术服务 分类

➤ 直接法与间接法比较：

- ◆ 直接法操作步骤少，但灵敏度不高，而间接法由于免疫球蛋白分子表面有多个抗原决定簇，可以结合多个荧光抗体分子，而起到放大作用，敏感性比直接法高出5-10倍。
- ◆ 间接法缺点：参与因素多，比直接法易出现非特异性荧光，故需严格优化、控制实验条件。
- ◆ 直接法只能测抗原，而间接法常用来测抗体，但也可测抗原。

碧云天免疫荧光技术服务

实验步骤



碧云天免疫荧光技术服务

细胞爬片

➤ 细胞固定

● 固定的目的

- ✓ 组织和细胞的蛋白质凝固，终止内源性或外源性酶反应，原位保存抗原，避免抗原失活或弥散。
- ✓ 停止细胞中的生化反应，固定其中的各种生化物质状态，防止细胞死亡后出现自溶分解。
- ✓ 使细胞中蛋白质、脂肪、糖、酶等成分转变为不溶性物质，以保持生前形态。
- ✓ 固定细胞形态，防止其变形或破裂。
- ✓ 使组织内各种物质产生不同的折光率，便于观察和鉴定。
- ✓ 使不同组织成分对染料有不同的亲和力，便于染色。

碧云天免疫荧光技术服务

组织切片制作

➤ 冰冻切片制备

- 建议用新鲜组织，否则组织细胞内部结构破坏，易使抗原弥散。
- 选用干净锋利的刀片，组织一定要冷冻适度，防止裂片和脱片严重。

碧云天免疫荧光技术服务

血清封闭

➤ 血清封闭

- 为防止内源性非特异性蛋白抗原的结合，需要在一抗孵育前先用血清封闭，减弱背景着色。
- 封闭是血清与非特异性位点结合，以消除非特异性染色，提高目的蛋白的准确性和降低背景。
- 血清封闭时间根据实验调整，一般是30min-60min，室温。

碧云天免疫荧光技术服务

一抗孵育

➤ 一抗孵育

- 在免疫荧光实验中至关重要，包括孵育温度、时间以及抗体浓度。
- 一抗孵育温度通常是4°C、室温、37°C，以4°C孵育效果最佳。
- 孵育时间：与温度、抗体浓度有关，通常37°C孵育1-2h；4°C孵育过夜后复温45min。
- 具体实验条件根据实验需要调整。

碧云天免疫荧光技术服务

二抗孵育

➤ 二抗孵育

- 二抗孵育过程中要注意避光处理。
- 二抗孵育温度通常是室温或37°C。
- 孵育时间：与温度、抗体浓度有关，通常孵育0.5-1h。
- 荧光素标记的二抗随着保存时间的延长，可能会有大量游离荧光素贴壁残留，配制时注意将包装管适当离心后使用。
- 具体实验条件根据实验需要调整。

碧云天免疫荧光技术服务

二抗孵育

➤ 荧光二抗常用的荧光素主要有：

- 异硫氰酸荧光素(FITC)，最大吸收光谱490-495nm，最大发射光谱520-530nm，呈黄绿色荧光。
- 四乙基罗丹明(RB200)，最大吸收光谱为570nm，最大发射光谱为595-600nm，呈明亮橙色荧光。
- 四甲基异硫氰酸罗丹明(TRITC)，最大吸收光谱为550nm，最大发射光谱为620nm，呈橙红色荧光。

碧云天免疫荧光技术服务

复染、封片

➤ 复染

- 目的是形成细胞轮廓，从而更好地对目标蛋白进行定位。
- 一般常用DAPI复染细胞核。

➤ 封片

- 为了便于长期保存。
- 一般常用抗荧光淬灭封片液，缓冲甘油等。
- 注意避免产生气泡。

碧云天免疫荧光技术服务

采集图像

➤ 采集图像通常使用**荧光显微镜**或**激光共聚焦扫描显微镜**

◆ 荧光显微镜

- 荧光显微镜光源寿命有限，关闭汞灯至少在开启15-30min后，再次开启须待汞灯充分冷却后才能开启。
- 激发光长时间照射，会发生荧光的衰减和淬灭现象。
- 时效性：标本染色后最好即时观察，存放时间过久荧光会减弱。
- 使用的玻片等载体，必须厚度均匀，无明显的自发荧光。
- 若使用油镜，须保证镜油为无荧光镜油。
- 电源最好装稳压电路，否则电压不稳不仅会降低汞灯寿命，也会影响镜检的效果。

碧云天免疫荧光技术服务

采集图像

➤ 激光共聚焦扫描显微镜

(Confocal laser scanning microscope, CLSM)

- 用激光作扫描光源，逐点、逐行、逐面快速扫描成像，扫描的激光与荧光收集共用一个物镜，物镜的焦点即扫描激光的聚焦点，也是瞬时成像的物点。系统经一次调焦，扫描限制在样品的一个平面内。调焦深度不同，从而获得样品不同深度层次的图像，这些图像信息都储于计算机内，通过计算机分析和模拟，就能显示细胞样品的立体结构。
- 激光共聚焦扫描显微镜既可以用于观察细胞形态，也可以用于细胞内生化成分的定量分析、光密度统计以及细胞形态的测量，配合焦点稳定系统就可以实现长时间活细胞动态观察。

碧云天免疫荧光技术服务

服务流程



附件 《碧云天免疫荧光询价单》

《碧云天免疫荧光生物样品信息表》

《碧云天免疫荧光生物送样要求》

碧云天免疫荧光技术服务

询价与订购

- 请您下载并填写《碧云天免疫荧光技术服务询价单》，发送至service@beyotime.com，我们的专业技术人员将在第一时间为您提供准确报价。
- 若有订购意向，碧云天的技术服务人员会与您联系，并签订《碧云天免疫荧光服务协议书》。
- 送样时，请下载并填写《碧云天免疫荧光生物样品信息表》，发送至service@beyotime.com或碧云天免疫荧光技术服务人员邮箱，样品的具体要求参见《碧云天免疫荧光生物送样要求》。

碧云天免疫荧光技术服务

客户须知

➤ 样品要求

- 客户需提供固定好的组织/组织切片/细胞爬片/包埋好的蜡块组织，详细的样品资料(如组织来源等)。
- 组织切片厚度小于50 μm 。
- 用于石蜡包埋的组织，活检或手术切除标本应在2小时内取材或固定，避免组织自溶及抗原变性等影响免疫荧光结果。
- 用于冰冻切片的组织，取材后应立即液氮速冻，-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。
- 取材时应保持所检样本原有的结构、形态，为避免挤压组织，尽量使用锋利刀片，并且避开坏死组织，除取病灶或含待检抗原部位外，还应取病灶与正常交界处，即所取组织切片中同时应有抗原阳性和阴性区，以形成自身对照。
- 若客户提供一抗，须为符合技术要求的浓缩或即用型一抗，同时提供抗体说明书；也可由碧云天代购。
- 具体的样本寄送要求详见《碧云天免疫荧光生物送样要求》和《碧云天免疫荧光生物样本信息表》。

碧云天免疫荧光技术服务

客户须知

➤ 服务说明

- 预实验与正式实验均按照切片张数进行收费。
- 客户应对所提供的材料及信息负责，如因客户提供的材料及信息不准确而引起的实验延误或经济损失由客户承担。
- 因科学实验的不确定性，实验结果不一定会出现阳性结果，我们保证实验结果的真实准确性，但是对结果是否符合预期不做承诺。

碧云天免疫荧光技术服务

服务承诺

➤ 碧云天免疫荧光技术服务承诺

◆ 碧云天承诺交付：

- ✓ 1张显微镜图片/切片；
- ✓ 染色后的切片；
- ✓ 完整实验报告，包括：实验步骤、荧光检测照片。

Thank You



碧云天
Beyotime



碧云天网站



微信公众号

碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology
订购热线：400-168-3301或800-8283301
技术咨询：info@beyotime.com
技术服务：service@beyotime.com
网址：<http://www.beyotime.com>