



碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology  
 订货热线: 400-1683301 或 800-8283301  
 订货 e-mail: order@beyotime.com  
 技术咨询: info@beyotime.com  
 网址: http://www.beyotime.com

## 免疫荧光染色试剂盒—抗兔AF555

产品编号	产品名称	包装
P0179	免疫荧光染色试剂盒—抗兔AF555	>300次

### 产品简介:

- 免疫荧光染色试剂盒(Immunol Fluorence Staining Kit)系列是碧云天开发的用于细胞或组织切片免疫荧光染色的试剂盒。在有一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—抗兔AF555 (Immunol Fluorence Staining Kit with AF555-Labeled Donkey Anti-Rabbit IgG), 含有AF555标记的驴抗兔IgG (H+L)抗体, 可以用于检测兔来源的相应一抗, 观察到的颜色为非常鲜艳的红色。
- AF染料是一系列由香豆素(Coumarin)、罗丹明(Rhodamine)、黄嘌呤(Xanthene)和花青(Cyanine)等传统染料经磺化(Sulfonation)和额外的化学修饰而合成的荧光染料, 由Molecular Probes公司研发并注册了商标Alexa Fluor。相应的荧光探针例如Alexa Fluor 488常被简称为AF488, 甚至直接被简称为488。AF系列染料具有以下优点: 家族成员众多, 激发和发射光谱跨越可见光到红外光, 具有蓝色到红色各种荧光颜色, 可选择性强; 相较于合成AF的原始染料, 磺化使染料带负电并具有亲水性, 无需使用有机溶剂即可与靶标偶联, 所得偶联物在储存期内不易沉淀; 化学修饰提高了染料的性能, 使染料具有更好的光稳定性和信号强度, 用户有更多的时间采集、捕捉荧光信号, 也更适合低丰度靶标的检测; 具有优良的生物相容性和低毒性[1]; pH敏感性更低, 在4-10的宽pH范围内保持高荧光强度, 化学稳定性强。AF系列染料可广泛用作抗体和其它蛋白质的标记, 是荧光显微镜、流式细胞术、荧光酶标仪等基于荧光的应用中的最常用的一类荧光染料。
- AF555是一种常用的非常明亮的红色荧光探针。它比绝大部分常用的红色荧光探针更加明亮, 更加不容易淬灭, 而且背景更低。AF555的荧光光谱和Cy3非常接近。AF555的吸收(激发)和发射峰参见下表。

Fluorophore	Absorption Peak (nm)	Emission Peak (nm)
AF555	555	565

- 本试剂盒提供了含有荧光标记抗体稳定剂的免疫荧光染色二抗稀释液, 可以确保荧光标记抗体稀释后在4°C可以保存长达6个月, 并且在6个月内至少可以重复使用10次。
- 本试剂盒含有抗荧光淬灭封片液, 可以使荧光更加持久。
- 本试剂盒对于六孔板内的细胞样品或常规切片, 至少可以检测300个样品。

### 包装清单:

产品编号	产品名称	包装
P0179-1	抗兔AF555	0.03ml
P0179-2	免疫荧光染色二抗稀释液	50ml
P0179-3	抗荧光淬灭封片液	15ml
—	说明书	1份

### 保存条件:

-20°C保存, 一年有效。同时抗兔AF555需避光保存。

### 注意事项:

- 需荧光显微镜或激光共聚焦显微镜。
- 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。
- 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°C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。
- 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。
- 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。
- 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(可以向碧云天订购)。
- 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。
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

### 使用说明:

#### 1. 免疫荧光染色的准备工作:

a. 固定液的准备:

推荐使用碧云天生产的免疫染色固定液(P0098), 也可以用4%多聚甲醛作为固定液, 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. 洗涤液的准备:

推荐使用碧云天生产的免疫染色洗涤液(P0106), 也可以按照如下方法配制TBSTx作为洗涤液:

10XTBS的配制: 称取24.2g Tris (Tris碱), 80g NaCl; 用盐酸调节pH值至7.6, 定容至一升。

TBS配制: 把10XTBS按照1:9的比例用水稀释至1X即为TBS。

TBSTx的配制: 在TBS中加入Triton X-100使最终浓度为0.1%, 混匀, 即为TBSTx。

c. 封闭液的准备:

推荐使用碧云天生产的免疫染色封闭液(P0102), 也可以按照如下方法配制含5%BSA的TBSTx作为封闭液:

含5%BSA的TBSTx的配制: 在100毫升TBSTx中加入5克BSA, 溶解并混匀, 即为含5%BSA的TBSTx。

d. 一抗稀释液的准备:

推荐使用碧云天生产的免疫染色一抗稀释液(P0103), 也可以使用上述封闭液, 即含5%BSA的TBSTx, 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:

把荧光标记的二抗, 按照1:1000的比例用本试剂盒提供的免疫荧光染色二抗稀释液进行稀释。根据荧光的强弱, 稀释的比例可以适当提高或降低。

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1ml固定液, 固定10分钟或更长时间(可4°C固定过夜)。

c. 去固定液, 用洗涤液洗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. 用封闭液封闭60分钟, 可以在摇床上轻轻摇动。

e. 去封闭液, 用稀释的特定一抗作用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作用过夜。

f. 去除一抗, 用洗涤液洗涤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。

g. 去除洗涤液, 加入1毫升稀释好的荧光标记的二抗避光孵育60分钟, 可以在摇床上轻轻摇动。

h. 回收荧光标记的二抗, 用洗涤液洗涤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。

i. 滴一滴本试剂盒提供的抗荧光淬灭封片液于载玻片上, 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。

j. 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1.5ml离心管内, 吸除上清后轻轻弹散细胞。

b. 加入0.5ml固定液, 缓缓悬起细胞, 固定10分钟或更长时间(可4°C过夜)。

c. 离心去固定液, 用洗涤液洗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微升液体, 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, 通过离心把细胞贴在载玻片上。

f. 用封闭液封闭60分钟。封闭及后续的操作可以用碧云天的染色缸和染色架或邮寄夹进行操作。

g. 去封闭液, 用稀释的特定一抗作用60分钟。为增强与一抗的结合, 可以4°C作用过夜。

h. 去除一抗, 用洗涤液洗涤3-5次, 每次3-5分钟。

i. 去除洗涤液, 加入稀释的荧光标记的二抗避光孵育60分钟。

j. 回收荧光标记的二抗, 用洗涤液洗涤3-5次, 每次3-5分钟, 期间适当注意避光操作。

k. 滴一滴本试剂盒提供的抗荧光淬灭封片液于载玻片上, 盖上盖玻片, 尽量避免气泡。

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。

4. 对于组织切片:

a. 对于石蜡切片, 需先完成脱蜡、水化和抗原修复。对于冰冻切片可以直接按照下面的步骤操作。

b. 用固定液固定10分钟或更长时间(可4°C过夜)。固定及后续的操作可以用碧云天的染色缸和染色架或邮寄夹进行操作。

c. 去固定液, 用洗涤液洗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. 用封闭液封闭60分钟, 可以在摇床上轻轻摇动。

e. 去封闭液, 用稀释的特定一抗作用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作用过夜。

f. 去除一抗, 用洗涤液洗涤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。

g. 去除洗涤液, 加入1毫升稀释好的荧光标记的二抗避光孵育60分钟, 可以在摇床上轻轻摇动。

h. 回收荧光标记的二抗, 用洗涤液洗涤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。

i. 滴一滴本试剂盒提供的抗荧光淬灭封片液于载玻片上, 盖上盖玻片, 尽量避免气泡。

j. 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。

参考文献:

1. Ostad SN, Babaei S, Bayat AA, Mahmoudian J. Monoclon Antib Immunodiagn Immunother. 2019. 38(1):25-29.

## 使用本产品的文献：

1. Wang F, Liang YJ, Wu XP, Su XD, Fu LW. . ABCG2-overexpressing S1-M1-80 cell xenografts in nude mice keep original biochemistry and cellbiological properties. *Chin J Cancer*. 2012 Mar;31(3):150-8.
2. Sun J, Liu X, Gao H, Zhang L, Ji Q, Wang Z, Zhou L, Wang Y, Sui H, Fan Z, Li Q. . Overexpression of colorectal cancer oncogene CHRDL2 predicts a poor prognosis. *ONCOTARGET*. 2017 Feb 14;8(7):11489-11506.
3. Yu DJ, Wang XJ, Shi YF, Jiang CY, Zhao RZ, Zhu YP, Chen L, Yang YQ, Sun XW, Xia SJ. . Macrophages are targets of retinoic acid signaling during the wound-healing process afterthulium laser resection of the prostate. *ONCOTARGET*. 2017 May 26;8(42):71996-72007.
4. Xudong Wang, Taiqiu Chen, Zhihui Deng, Wenjie Gao, Tongzhou Liang, Xianjian Qiu, Bo Gao, Zizhao Wu, Jincheng Qiu, Yuanxin Zhu, Yanbo Chen, Zhancheng Liang, Hang Zhou, Caixia Xu, Anjing Liang, Peiqiang Su, Yan Peng, Dongsheng Huang . Melatonin promotes bone marrow mesenchymal stem cell osteogenic differentiation and prevents osteoporosis development through modulating circ\_0003865 that sponges miR-3653-3p *Stem Cell Res Ther*. 2021 Feb 25;12(1):150.
5. Wenwen Cui, Yuanyuan Hao, Mingye Wang, Qiuyan Zhang, Junmei Wang, Gang Wei, Yunlong Hou . Inhibition of Autophagy Facilitates XY03-EA-Mediated Neuroprotection against the Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury in Rats *Oxid Med Cell Longev*. 2022 Mar 30;2022:7013299.
6. Nie J, Cao X, Zhou M, Zhang X, Zhang R, Niu L, Xia Y, Hou L, Wang C. . Musca domestica pupae lectin induces apoptosis in HepG2 cells through a NF- $\kappa$ B/p65-caspase pathway. *B CANCER*. 2012 Apr 1;99(4):E49-54.
7. Meng X, Li F, Chen S, Tang C, Zhang W, Wang Z, Zhao S. . Cloning and expression of neuron-specific enolase in the corpus luteum of dairy goats. *Gene*. 2012 Jul 25;503(2):222-8.
8. Zhang W1, Wu Q1, Lu YL1, Gong QH1, Zhang F1, Shi JS1. . Protective effects of *Dendrobium nobile* Lindl. alkaloids on amyloid beta (25-35)-induced neuronal injury. *Neural Regen Res*. 2017 Jul;12(7):1131-1136.
9. Fan DX, Yang XH, Li YN, Guo L . 17 $\beta$ -Estradiol on the Expression of G-Protein Coupled Estrogen Receptor (GPER/GPR30) Mitophagy, and the PI3K/Akt Signaling Pathway in ATDC5 Chondrocytes In Vitro. *MED SCI MONITOR*. 2018 Apr 2;24:1936-1947.
10. Dong-Xiao Fan, Xu-Hao Yang, Yi-Nan Li, Lei Guo . 17 $\beta$ -Estradiol on the Expression of G-Protein Coupled Estrogen Receptor (GPER/GPR30) Mitophagy, and the PI3K/Akt Signaling Pathway in ATDC5 Chondrocytes In Vitro *MED SCI MONITOR*. 2018 Apr 2;24:1936-1947.
11. Zhang L, Zhao Y, Guo L. . 17 $\beta$ -estradiol protects INS-1 insulinoma cells from mitophagy via G protein-coupled estrogen receptors and the PI3K/Akt signaling pathway. *Int J Mol Med*. 2018 May;41(5):2839-2846.
12. Zhang L, Zhao Y, Guo L . 17 $\beta$ -estradiol protects INS-1 insulinoma cells from mitophagy via G protein-coupled estrogen receptors and the PI3K/Akt signaling pathway. *Int J Mol Med*. 2018 May;41(5):2839-2846.
13. Shen J, Tu L, Chen D, Tan T, Wang Y, Wang S . TRPV4 channels stimulate Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release in mouse neurons and trigger endoplasmic reticulum stress after intracerebral hemorrhage. *Brain Res Bull*. 2019 Mar 146:143-152.
14. Zhong X, Xiao Q, Liu Z, Wang W, Lai CH, Yang W, Yue P, Ye Q, Xiao J . TAK242 suppresses the TLR4 signaling pathway and ameliorates DCD liver IRI in rats. *Mol Med Rep*. 2019 Sep 20(3):2101-2110.
15. Bei-Yao Gao, Yi-Xing Cao, Peng-Fei Fu, Ying Xing, Dan Liang, Shan Jiang, Yu-Xiao Xie, Min Li . Optogenetics stimulates nerve reorganization in the contralesional anterolateral primary motor cortex in a mouse model of ischemic stroke *Neural Regen Res*. 2022 Jul;17(7):1535-1544.
16. Jiahong Yang, Xiaolin Sun, Ning Huang, Peng Li, Jiaqi He, Lan Jiang, Xuemei Zhang, Shu Han, Hong Xin . Entacapone alleviates acute kidney injury by inhibiting ferroptosis *FASEB J*. 2022 Jul;36(7):e22399.
17. Chi Li, Yang-Jie Ru, Quan-Yue Lin, Guang-Chun Gao, Yu-Die Yang, Xiao-Qin Zhang, Jin-Lai Gao, Shi-Hui Liu, Chu-Wei Zheng, Lin Wang, Ya-Xin Zheng, Ji-Ming Wu . Schisantherin D from *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. exhibits anti-liver fibrosis capacity via modulating ETBR involved signaling, an in vitro and in vivo study *Fitoterapia*. 2022 Oct;162:105290.
18. Fengxia Liu, Mujun Li . BNIP3-mediated autophagy via the mTOR/ULK1 pathway induces primordial follicle loss after ovarian tissue transplantation *J Assist Reprod Genet*. 2023 Mar;40(3):491-508.
19. Yuanyuan Hao, Tao Song, Mingye Wang, Tongtong Li, Chi Zhao, Ting Li, Yunlong Hou, Hongjiang He . Dual targets of lethal apoptosis and protective autophagy in liver cancer with periplocymarin elicit a limited therapeutic effect *Int J Oncol*. 2023 Mar;62(3):44..
20. Mengzhi Li, Peng Wang, Jingting Li, Fei Zhou, Shixin Huang, Shaohai Qi, Bin Shu . NRP1 transduces mechanical stress inhibition via LATS1/YAP in hypertrophic scars *Cell Death Discov*. 2023 Sep 13;9(1):341..
21. Jia Li, Zheng Hu, Jiwei Zhu, Xin Lin, Xu Gao, Guixiang Lv . Antitumor Effects of Pegylated Zinc Protoporphyrin-Mediated Sonodynamic Therapy in Ovarian Cancer *Pharmaceutics*. 2023 Sep 4;15(9):2275.

Version 2025.03.12