

Immunofluorescence (IF)

20200211 HW Chung

➤ Materials

- 4-paraformaldehyde
- Immunopen
- IF washing buffer (0.1% Tween-20 in TBS)
- Triton-X 100
- IF blocking solution (5% BSA+0.3% Triton-X 100 in TBS)
- IF antibody solution (1% BSA+0.3% Triton-X 100 in TBS)
- DAPI
- Mounting solution (Vectashield, H-1000)
- Slide glass

➤ Process

Step 1: Cell Fixation & Permeabilization

- Cryosection slide를 바로 꺼내서 (section이 건조되지 않도록 주의!) Immunopen으로 section된 조직 주변을 표시한 뒤, 4-paraformaldehyde를 넣고 15 min 상온 (만약 형광이 달려있는 경우 차광상태 유지)
- IF washing buffer로 3번 washing
- 0.1 ~ 0.2% Triton X (PBS에 희석) 넣어주고 15 min 상온 (만약 형광이 달려있는 경우 차광상태 유지)
- IF washing buffer로 3번 washing

Step 2 : Antibody staining

- Blocking buffer 넣고 1 hr 상온
- IF washing buffer로 3번 washing
- 1차 antibody를 IF antibody solution에 100배~200배 희석하여 넣어주고 4도 냉장고에서 overnight (건조되지 않도록 주의!!)
- 다음날 1차 antibody는 재사용을 위해 tube에 모아서 냉장에 보관하고 (2번~3번정도 재사용 가능), IF washing buffer로 3번 washing
- 1차 antibody에 해당하는 2차 antibody를 IF antibody solution에 250~500배 희석하여 넣어주고, 이 때 핵 염색을 위한 DAPI도 1000배 희석하여 넣어줌 (만약 F-actin 염색을 진행하는 경우, Rhodamin Phalloidin을 250배 희석하여 이 단계에서 DAPI와 함께 염색)
- IF washing buffer로 3번 washing

Step 3 : Mounting

- Washing buffer를 하나씩 제거해주고, 건조시킨 뒤 mounting solution 넣어주고 slide glass 올리고 기포가 없어지도록 집게로 glass를 꼭꼭 눌러줌
(glass 눌러서 기포없앨 때 여분의 mounting solution은 휴지로 조심히 제거)
- Glass 경계부위에 매니큐어를 발라서 냉장 보관 (샘플 건조 방지)