**冰冻切片（厚片）及免疫荧光染色**

1、样品固定：

1）小鼠完整骨组织置于5ml 4% PFA (PBS配)中4度固定过夜。

注意：PFA固定对抗原表位有遮蔽作用，对敏感表位，建议灌注固定+30min体外固定

2）10ml PBS洗三遍（4度、5min）

2、脱钙/脱水：

1）骨组织置于10ml 0.5M EDTA（水配）中，4度摇晃，24h

2）PBS洗一遍，加入10ml CPT液（30%蔗糖 in PBS）,4度，24h

3、包埋/冰冻

1）制备EBM=**8% gelatin** +30%蔗糖 in PBS, 60度制备使之熔化

2）骨组织置于EBM中，轻放避免气泡，室温冷却30min,至EBM凝固

3）以上置于-80度过夜冰冻（可在-80度保存6个月）

4、切片

1）切片机机箱温度设置为-25度，样本从-80度取出放在机箱内，使之平衡到-20度。

2）以**30-50um**厚度，慢速切片，以最小号毛刷轻拉展平切下的片子。1min之内以洁净载玻片迅速轻压切片，使之转移至玻片上。室温静置30min至EBM完全融化蒸干。

注意：慢切、边切边展平、快速转移到载玻片上，载玻片保持水平可以防止组织出现空泡。

3）样本片直接免疫染色，或置于-20保存（可保存1年）

5、免疫荧光染色

1）PAP笔在样本周围画框，完全晾干，以防水

注意：完全晾干才能防水

2）水化：框内加入200ul PBS，室温，5min

3）通透：吸除PBS，加入200ul 0.3%TritonX-100(in PBS)，室温15min

4）封闭：吸除以上液体，加入封闭液（5% donkey serum in PBS），室温30min

5）孵育一抗：一抗（1：50—1：200，或终浓度2-4ug/ml），以抗体稀释液（0.1% TritonX-100 +5% donkey serum in PBS）稀释，200ul加在样本上，放入含湿棉球的暗盒中，4度过夜。

6）洗涤：吸出一抗，PBS 200ul, 室温洗三次，5min一次

7）孵育二抗：二抗（终浓度2-4ug/ml）以抗体稀释液稀释，200ul加入，室温1-2h，可同时加入DAPI(1:1000)，以PE塑料薄膜覆盖防止液体蒸发。

8）洗涤：吸出二抗，PBS 200ul, 室温洗三次，5min一次

9）封片：以DABCO（封片剂）封片，避免产生气泡，上机观察，或避光置于4度，一周内观察。