**Immunoflourecence Staining**

**Day1**

1. Örnek sayısı kadar coverslip’i 24-well plate’in wellerine yerleştirilir. (Önce 1 damla medium koyup üzerine coverslip koyulursa daha rahat yapışır)
2. Hücreler yeterli sayıda olacak kadar **500ul medium** ile coverslipin üzerine ekilir. (T24 25k, 5637 40k hücre yeterli)

**Day2**

1. 24 saat sonunda medium vakum ile çekilir.
2. 250 ul 1X PBS ile 2 kez yıkanır.
3. 250 ul 4%’lük formaldehit (in PBS) ile **15 dk oda sıcaklığında** shaker üzerinde fixlenir.
4. 250 ul 1X PBS ile 2 kez yıkanır.
5. 250 ul 0.2%’lik TritonX (in PBS) ile **45 dk oda sıcaklığında** shaker üzerinde porlar açılır.
6. 250 ul 1X PBS ile 2 kez yıkanır.
7. 250 ul 2%’lik goat serum (in PBS) ile **45 dk oda sıcaklığında** shaker üzerinde bloklanır.
8. Goat serum çekilir.
9. Parafilm üzerine yaklaşık 80 ul damla halinde 2% Goat antibody içinde IF protokolüne göre dilüe edilmiş primer antibody konulur. Bir şırınga iğnesi yardımı ile coverslipleri kaldırılır. Ters çevirerek primer antibody üzerine dikkatlice konulur. Parafilmleri ıslak bir peçete üzerinde bir kutuya konulur. (Katlanmasın veya kaymasın diye)
10. Overnight +4C’de shaker a gerek olmadan bağlanmaya bırakılır.

**Day3**

1. Coverslipler tekrar ters çevrilerek (hücre olan yüzeyi üste gelecek şekilde) 24 well plate e yerleştirilir.
2. 250 ul 1X PBS ile 2 kez yıkanır.
3. 20 ul Sekonder antibody Alexa 594 rabbit (1/500 goat 2% serumda) + DAPI (fc. 300nM) **2 saat oda sıcaklığında** shaker üzerinde bağlanır.
4. Medium yavaşça çekilir.
5. 250 ul 1X PBS ile 2 kez yıkanır.
6. Lamlar 2’şer coverslip alacak şekilde hazırlanabilir. 2 ucuna 1er damla 8ul mounting medium veya %50 glycerol (su ile dilüe edilmiş) damlatılır.
7. Coverslipler ters çevrilip mounting mediuma denk gelecek şekilde lamlara kapatılır.
8. Üzerlerine oje sürülerek sabitlenmesi sağlanır ve önce oda sıcaklığında kuruması beklenir. Daha sonra +4C de görüntü alana kadar beklenir.
9. Konfokalde görüntü alınır.
10. +4C’de long term saklanabilir.

Dilution factor of primer antibodies:

Syp🡪1:100

CD56🡪 1:100

Eno2🡪 1:400

Syp🡪 1:100

B-catenin 🡪 1:150

Dilution factor for seconder Ab:

Alexa 594 rabbit 🡪 1:500

DAPI: stock conc🡪 300 uM ; final conc🡪 300 nM