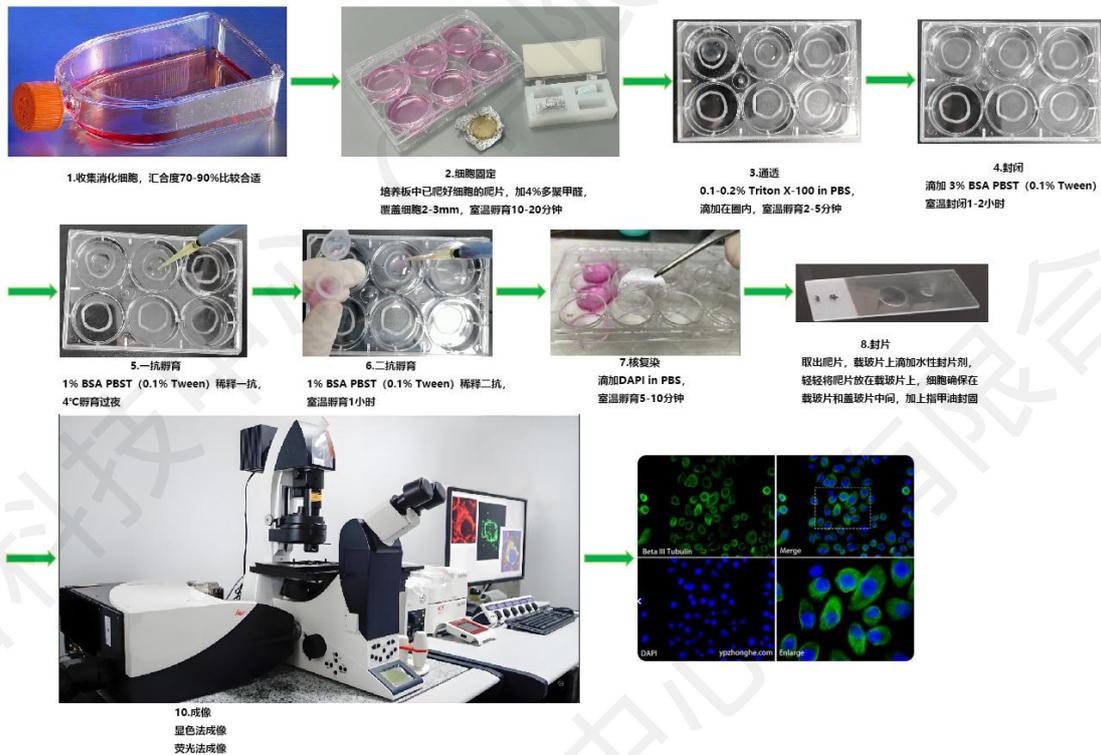


免疫荧光染色-细胞 ICC/IF



目录

.....	错误！未定义书签。
1. 样本制备和固定	2
1.1. 贴壁细胞样本的制备和固定	2
1.1.1. 爬片的准备（可选步骤）	2
1.1.2. 包被爬片（可选步骤）	2
1.1.3. 细胞爬片制备	3
1.1.4. 细胞爬片的固定	4
1.2. 悬浮细胞样本制备和固定	4
1.2.1. 包被载玻片或培养板	4
1.2.2. 细胞悬液滴片的制备和固定	4
2. 通透	5
2.1. 通透剂选择	5
2.2. 通透步骤	5
3. 封闭	6
3.1. 封闭剂选择	6
3.2. 封闭步骤	6
4. 一抗孵育	6
5. 二抗孵育	6
6. 复染和检测	7
7. 免疫荧光染色常见问题解析	7

1. 样本制备和固定

1.1. 贴壁细胞样本的制备和固定

1.1.1. 爬片的准备（可选步骤）

1. 准备干净的盖玻片，经过酸和乙醇处理。也可以购买专用爬片，直接使用不需要处理。
2. 根据实验要求，将盖玻片剪裁成合适的大小，以备置于 6 孔板、12 孔板或 24 孔板；裁剪时用细沙粒轻划一下，稍用力掰开。如接种大皿，请不要将盖玻片切开，直接清洁后放入培养皿中，待染色时再切开，这样既保证了细胞均一性，又可同时做多个指标的染色。
3. 将剪裁好的爬片，置于浓硫酸中浸泡过夜（最好逐片浸入，多片浸入会引起多片粘连、浸洗不充分）以彻底清除表面的污染物。第二天用自来水冲洗 20 遍。
4. 将爬片置于无水乙醇中浸泡 6 小时，用三蒸水冲洗 3 遍，确保爬片表面干净无残留。
5. 最后，将爬片放在饭盒或玻璃培养皿中烘干，并进行高压消毒处理。消毒后的爬片放入烤箱中烤干，备用。

1.1.2. 包被爬片（可选步骤）

1. 制备包被溶液并过滤，必要时做灭菌处理。

多聚赖氨酸 PLL 包被液		胶原蛋白包被液		明胶包被液	
Poly-L/D-lysine 溶液 (5mg/mL)	0.2mL	鼠尾胶原蛋白 I型 (1 mg/mL)	0.12mL	1%明胶溶液	1mL
PBS 溶液	9.8mL	PBS 溶液	9.88mL	PBS 溶液	9mL
定容至 10mL（可根据实际用量调整），过滤除菌					
常用浓度为 0.1mg/mL		常用浓度为 12μg/mL		常用浓度为 0.1%	
通过改变培育基质外表的电极来促进细胞贴壁，常用于神经元细胞、神经胶质细胞及转染细胞系等		常用于上皮细胞、肝细胞、肌细胞等原代细胞		正常或转染细胞如血管内皮细胞、心肌细胞、胚胎干细胞、胰岛细胞等	

2. 将盖玻片浸在包被液中，放入 37℃ 培养箱。多聚赖氨酸 PLL 包被需要静置 30-60 分钟，胶原蛋白和明胶包被需要静置 1-2 小时。

培养容器	包被液参考用量
12 孔板	0.5mL
6 孔板	0.8-1mL
6cm 培养皿	1-1.5mL
10cm 培养皿	3mL
T25 培养瓶	1-2mL

3. 吸除多余包被液。放入 37℃ 培养箱（也可放 4℃ 冰箱，保持无菌即可），静置 4-24 小时。
4. 无菌 PBS 冲洗盖玻片 3 次，每次 5 分钟
5. 将盖玻片放在饭盒或玻璃培养皿中烘干备用。如有需要，在紫外线下灭菌至少 4 小时。

1.1.3. 细胞爬片制备

1. 从培养箱中取出培养皿，在显微镜下观察细胞是否贴壁良好，并检查细胞活性。对于大部分细胞，汇合度在 70-90% 比较合适。
2. 吸除多余的培养基，然后用无菌 PBS、Hanks 液或无血清培养液洗涤细胞 1 次，以去除残余的血清。
3. 吸除 PBS，加入少量胰酶细胞消化液，略盖过细胞即可，放入培养箱消化细胞 30 秒至 2 分钟（时间依据细胞特性）。用枪轻轻吹打细胞，细胞脱落后，吸除胰酶细胞消化液，加入等体积的含 10%FBS 的完全培养基终止胰酶消化。

消化液	应用及特点	来源
Trypsin 胰蛋白酶 (0.25%)	水解细胞间的蛋白质，破坏细胞间的连接，适用于绝大多数贴壁细胞	动物源
Trypsin 胰蛋白酶 -EDTA (0.25%)	EDTA 能螯合细胞表面的 Ca ²⁺ 或 Mg ²⁺ 离子，削弱细胞间的连接，更容易被消化，适用于难以消化的细胞类型，如上皮类细胞。消化不能被血清抑制，必须彻底清洗	动物源
TrypLE Express	温和、适用于绝大部分贴壁细胞	无动物源
TrypLE Select	温和及便捷的生物制品和工业应用	无动物源
TrypLE Select (10 ×)	温和与快速强贴壁细胞	无动物源
Accutase	专门用于神经及多能干细胞	无血清，动物源
胶原酶	常用于富含胶原蛋白的细胞	动物源
Dispase II	常用于从不同的组织或器官分离出单细胞，还可用于消除悬浮细胞培养过程中的细胞聚集	细菌来源

4. 消化好的细胞转移到 15mL 离心管，1000-2000×g 离心 1 分钟，沉淀细胞。吸除上清，注意不要吸到底部细胞，加入 1mL 培养基重悬细胞。
5. 根据细胞计数仪的要求，吸取 10-20 μl 细胞进行计数，同时计算后续实验接种细胞的体积（24 孔板一般接种 1 万个细胞）。
6. 加细胞前，在培养板每个孔中，先滴加少量培养基（目的是使爬片与培养皿靠液体的张力粘合到一起），然后轻放爬片（注意不要产生气泡，防止加细胞悬液时爬片漂起）。整个过程注意无菌操作。
7. 吸取计算好体积的细胞悬液，添加到含细胞爬片的孔板中。全部加完后，用十字交叉法晃匀孔板中的细胞，置于培养箱中过夜。

1.1.4. 细胞爬片的固定

1. 在培养板中将已爬好细胞的爬片（汇合度为 60-80%为宜，细胞活性应为 90-95%）用 PBS 浸洗 3 次，每次 5 分钟，轻轻晃动，避免将细胞冲掉。
2. 按照下表步骤固定孵育细胞（细胞自带荧光时注意避光）。

固定剂	固定条件	适用情况	透化步骤
4%多聚甲醛的 PBS 溶液	室温下孵育 10-20 分钟	细胞核蛋白优先推荐	超过 10-15 分钟，需要抗原修复。如需要透化，可选择丙酮或甲醇
甲醇（95-100%）	-20℃下孵育 5-10 分钟	悬浮细胞推荐使用 80%甲醇，贴壁细胞推荐使用 100%甲醇	甲醇会透化细胞，不需要透化
乙醇（95-100%）	-20℃下孵育 5-10 分钟	磷酸化蛋白检测优先推荐	乙醇会透化细胞，不需要透化
丙酮	-20℃下孵育 5-10 分钟		丙酮会透化细胞，不需要透化

3. 用洗涤缓冲液 PBS 洗涤细胞 3 次，每次 5 分钟。

1.2. 悬浮细胞样本制备和固定

1.2.1. 包被载玻片或培养板

1. 准备干净的载玻片和培养板，经过明胶、多聚赖氨酸或胶原蛋白等处理。也可以购买已经处理好的载玻片或培养板，可跳过包被的步骤。
2. 制备包被溶液并过滤，必要时做灭菌处理。吸取 0.1mL Poly-L-lysine 溶液(5mg/mL)，加入到 4.9mL 无菌 PBS 溶液中，轻柔混匀。
3. 将载玻片浸在包被液中，放入 37℃培养箱。静置 30-60 分钟。
4. 吸除多余包被液。放入 37℃培养箱（也可放 4℃冰箱，保持无菌即可），静置 4-24 小时。
5. 无菌 PBS 冲洗载玻片 3 次，每次 5 分钟
6. 将载玻片放在饭盒或玻璃培养皿中烘干备用。如有需要，在紫外线下灭菌至少 4 小时。

1.2.2. 细胞悬液滴片的制备和固定

1. 取对数生长细胞，轻柔吹打细胞，将总数 $1 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ 的细胞悬液（细胞活性应为 90-95%）转移到 2mL 离心管中。
2. 4℃ 200×g 离心 5 分钟，收集沉淀。
3. 加入 1mL 冰的洗涤缓冲液 PBS 温和上下颠倒，离心洗涤（4℃ 200×g，5 分钟）2-3 次，收集细胞沉淀。
4. 按照下表步骤固定孵育细胞（细胞自带荧光时注意避光）。

固定剂	固定条件	适用情况	透化步骤
-----	------	------	------

4%多聚甲醛的 PBS 溶液	室温下孵育 10-20 分钟	细胞核蛋白优先推荐	超过 10-15 分钟，需要抗原修复。如需要透化，可选择丙酮或甲醇
甲醇（95-100%）	-20℃下孵育 5-10 分钟	悬浮细胞推荐使用 80%甲醇，贴壁细胞推荐使用 100%甲醇	甲醇会透化细胞，不需要透化
乙醇（95-100%）	-20℃下孵育 5-10 分钟	磷酸化蛋白检测优先推荐	乙醇会透化细胞，不需要透化
丙酮	-20℃下孵育 5-10 分钟		丙酮会透化细胞，不需要透化

- 加入 1mL 冰的洗涤缓冲液 PBS 温和上下颠倒，离心洗涤（4℃ 200×g，5 分钟）3 次，收集细胞沉淀。
- 用 1mL 冰的洗涤缓冲液 PBS 重悬细胞，吸取 10 μL 细胞悬液（细胞密度为 10^6 - 10^7 个细胞/mL），转移到包被好的载玻片上，涂抹均匀。

2. 通透

2.1. 通透剂选择

通透可以溶解部分细胞膜，使抗体能够达到细胞内表位，一般用于细胞内蛋白和抗原表位位于胞内区的跨膜蛋白检测。

固定剂是 4%多聚甲醛 PFA 时，需要进行通透。固定剂是甲醇或丙酮等有机溶剂时，这些溶剂有固定和通透的作用，不需要再做通透处理。

溶剂	备注
Triton X-100 或 NP-40	Triton X-100 是最常用的通透剂，但是它会溶解膜和相关蛋白，不太适合用于膜相关抗原，非常适合于核抗原染色
	步骤： 在玻片上滴加 0.1-0.2% Triton X-100 in PBS，室温孵育 2-5 分钟。
Tween 20、皂苷、毛地黄皂苷和 leucoperm	较温和的细胞膜溶剂，会使细胞膜产生足够大的孔，促使抗体进入细胞内而不用溶解胞膜。适合于胞浆内抗原和表位在胞浆的表面抗原以及可溶的核抗原染色
	步骤： 在玻片上滴加 0.2-0.5% Tween 20 in PBS，室温孵育 2-5 分钟。

2.2. 通透步骤

- 先用免疫组化笔在培养板中的爬片上画圈，不要碰到或太靠近细胞。
- 制备 PBS（含 0.1-0.2% Triton X-100 或 0.2-0.5% Tween）通透溶液，将通透溶液滴在疏水圈内，并在室温下孵育 2-5 分钟。
- PBS 震荡洗涤细胞 3 次，每次 5 分钟。

3. 封闭

3.1. 封闭剂选择

ICC/IF 中，封闭步骤非常重要，可以防止图像中出现高背景染色。常用的封闭剂是与二抗宿主种属对应的血清，如二抗是山羊抗兔 IgG (H+L) -Alexa Fluor 488，封闭剂需用山羊血清；如二抗是驴抗兔 IgG (H+L) -Alexa Fluor 488，封闭剂则需用驴血清。但是封闭液不能使用含有一抗宿主的血清，如一抗是兔抗，就不能含有兔血清，否则二抗会和封闭剂结合，导致高背景。

BSA 也是一种常用的封闭剂，BSA 的种属依赖性较小，不用对应二抗的宿主种属，也不用避开一抗宿主种属，但是封闭效率可能不够高。

3.2. 封闭步骤

1. 参照抗体说明书，选择血清或者 BSA 作为封闭剂。
2. 制备封闭缓冲液，将选定的封闭剂溶于 PBS 中至 2-10%，加入甘氨酸至浓度为 0.1M（可选）。
3. 在培养板中疏水圈内滴加封闭液 [如 3% BSA PBST (0.1% Tween)]，室温封闭 1-2 小时。

4. 一抗孵育

1. 进行初次实验时，根据抗体说明书选择合适的抗体稀释比，用适当的抗体稀释液 [如 1% BSA PBST (0.1% Tween)] 稀释一抗。
2. 吸出封闭溶液，在培养板中疏水圈内加入稀释好的一抗，将培养板平放于湿盒中，4℃孵育过夜。
3. PBS 震荡洗涤细胞 3 次，每次 5 分钟。

5. 二抗孵育

1. 根据抗体说明书选择合适的稀释比，用适当的抗体稀释液 [如 1% BSA PBST (0.1% Tween)] 稀释荧光二抗。
2. 稍甩干，在培养板中疏水圈内加入稀释好的二抗，将培养板平放于湿盒，室温孵育 1 小时（避光）。
3. PBS 震荡洗涤细胞 3 次，每次 5 分钟。

6. 复染和检测

1. 稍甩干培养板，在疏水圈内加 DAPI-PBS，放于湿盒中室温孵育 5-10 分钟（避光）
2. 从培养板中取出爬片，取玻片时，将注射器针尖向背面弯曲，将爬片轻轻勾起，用小镊子取出。
3. PBS 清洗爬片 2 次，每次 5 分钟。
4. 在经过明胶、多聚赖氨酸或胶原蛋白等处理的载玻片上滴加水性封片剂，将爬片轻轻的放在载玻片上（注意不要产生气泡），确定细胞在盖玻片和载玻片之间。
5. 用柠檬烯或指甲油密封盖玻片防止变干，并移至荧光显微镜下观察。

7. 免疫荧光染色常见问题解析

问题	原因	解决方法
信号弱或无信号	样品孵育荧光抗体后，暴露于光线下时间过长，导致信号衰减	避光条件下进行孵育和样品储存，加封片剂后，立即对样品进行成像，以获得最佳结果
	细胞/组织样品的储存时间过长	使用新鲜制备的载玻片/板，以避免丧失抗原性
	封闭时间过长	封闭时间应保持常温 1 小时左右，或者 4℃ 过夜
	谜底蛋白表达低	修改检测方法，考虑放大信号，或与更亮的荧光团配对
	通透方法错误	更换通透方法
	抗体浓度过低，孵育时间较短	提高抗体浓度，孵育时间不可少于 1 小时
	抗体孵育温度不当	室温孵育 1-2 小时，或 4℃ 过夜
	操作过程中缓冲液残留较多，间接稀释抗体浓度	尽量沥干每步冲洗后的缓冲液
	滤光片选择不合适	更换滤光片
非特异性高背景	封闭不充分	封闭时间应保持常温 1-2 小时，或 4℃ 过夜，可适当提高封闭液浓度。使用与二抗同一物种来源的正常血清。
	样品自发荧光	以未经染色的样品为对照，检测自发荧光程度，添加 0.3M 的甘氨酸。或者选择较长的波长通道
	抗体浓度过高或孵育时间过长	降低抗体浓度，孵育时间，室温 1-2 小时，或 4℃ 过夜
	样品变干	整个染色过程始终保持样品处于液体中
	洗涤不充分	增加缓冲液洗涤次数和时间
染色定位不对	组织细胞中无抗原	设立阳性对照，以验证实验结果；换其他组织细胞检测
	固定方法不当	尝试换不同类的固定剂处理抗原样品