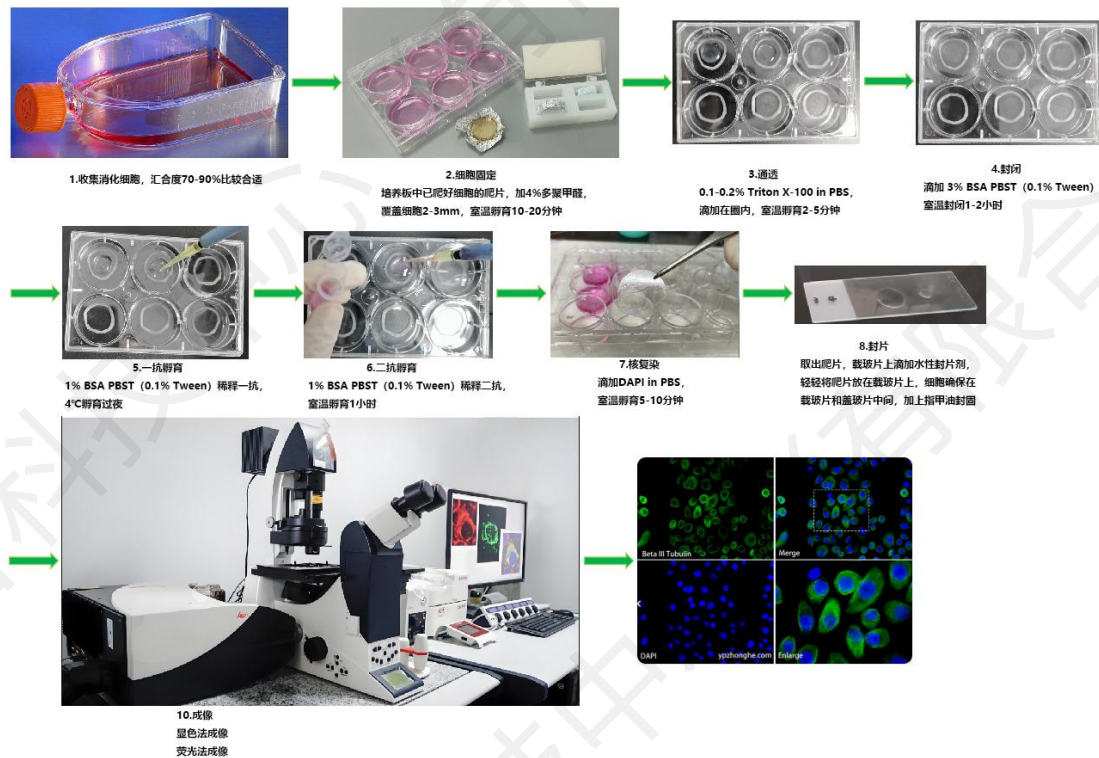


免疫荧光染色-细胞 ICC/IF 操作步骤



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 小砂轮轻划一下，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. 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。
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 10-20μl 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。

1.1.3. 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°C 培养箱。静置 30-60 分钟。
4. 吸除多余包被液。放入 37°C 培养箱（也可放 4°C 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°C 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°C 200×g，5 分钟）2-3 次，收集细胞沉淀。
4. 按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°C 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°C 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°C 下孵育 5-10 分钟		丙酮会透化细胞，不需要透化

5. 加入 1mL 冰的洗涤缓冲液 PBS 温和上下颠倒，离心洗涤（4°C 200×g，5 分钟）3 次，收集细胞沉淀。
6. 用 1mL 冰的洗涤缓冲液 PBS 重悬细胞，吸取 10 μ L 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

1. 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。
2. 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。
3. PBS 震荡洗涤细胞 3 次，每次 5 分钟。

3. 封闭

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。