

免疫荧光 (IF)

溶液和试剂配制

1. PBS缓冲液: 用PBS粉末和ddH₂O配成。
2. 4%多聚甲醛: 室温保存, 使用前需37°C预热。
3. 0.5% TritonX-100溶液: 用TritonX-100和PBS溶液配成, 4°C保存。
4. 封闭液: 即10%山羊血清, 用山羊血清和PBS溶液配成, -20°C保存。
5. 0.5 µg/mL DAPI染液: 用DAPI和PBS溶液配成, -20°C避光保存。

实验操作流程

A. 细胞样本制备:

1. 贴爬片: 取12孔板, 在孔中滴加20 µL PBS溶液, 夹取直径20 mm细胞爬片置于孔中, 轻轻将爬片往下压, 大气压作用使爬片紧紧贴合在孔板上, 避免后续爬片漂浮起来。
2. 洗涤爬片: 向每孔加入1 mL PBS溶液, 轻轻摇晃孔板, 用真空泵将PBS彻底吸除。
3. 细胞种板: 根据实验需要, 向孔板中加入细胞悬液, 培养细胞。

B. 固定:

1. 收细胞, 吸除培养基, 每孔加1 mL PBS溶液洗涤细胞, 洗3次, 每次3 min。
2. 每孔加入700 µL 4%多聚甲醛, 固定细胞10 min。
3. 用PBS洗涤3次, 每次3 min。

C. 通透:

1. 加700 µL 0.5% TritonX-100溶液, 对细胞破膜30 min。
2. 用PBS洗涤3次, 每次3 min。

D. 封闭:

每孔加入700 µL封闭液, 室温孵育45 min。

E. 一抗孵育:

1. 用封闭液配制一抗稀释液 (抗体稀释度可参考产品网站)。
2. 吸除旧封闭液, 每孔加入700 µL一抗稀释液, 4°C孵育过夜或室温孵育2.5 h。若4°C孵育, 第二天孵育完成后应先让细胞室温复温30 min, 再进行下一步骤。
3. 用PBS洗涤3次, 每次3 min。



F.二抗孵育：

- 1、选择识别一抗种属的荧光标记二抗，用封闭液配制二抗稀释液（抗体稀释度可参考产品网站，避光操作）。
- 2、向细胞表面滴加700 μ L二抗稀释液，室温孵育1 h（避光操作）。
- 3、用PBS洗涤3次，每次3 min（避光操作）。

G.细胞核染色：

- 1、加入 0.5 μ g/mL DAPI染液，室温孵育5 min（避光操作）。
- 2、用PBS洗涤3次，每次3 min（避光操作）。

H.封片：

- 1、用镊子夹出细胞爬片，并用吸水纸吸尽爬片周围水分。在载玻片上滴加适量抗荧光淬灭液，将爬片有细胞的那面贴合抗荧光淬灭液并放置其上，操作时尽量避免气泡产生（避光操作）。
- 2、在爬片周围滴加封片液以封片，待封片液晾干后，尽快在荧光显微镜下进行观察拍摄（避光操作）。如不能及时观察，应将爬片避光放于4℃保存，并在三天内进行观察拍摄以防止荧光淬灭。

实验注意事项

1. 每孔中需加4%多聚甲醛、0.5% TritonX-100、封闭液、一抗稀释液、二抗稀释液、DAPI染液的体积并不固定，可根据具体实验情况调整。但加入的液体至少需要没过爬片，以防细胞干涸。
2. 封片之前的实验操作过程应始终保持细胞呈湿润状态。
3. TritonX-100溶液长时间静置后容易出现分层现象，使用前需上下颠倒，使溶液重悬。
4. 本操作步骤中的爬片需要满足：无菌并经过表面处理，适用于细胞培养。

实验相关产品推荐

1. 抗体网站：<https://www.targetmol.cn/all-antibodies>
2. TritonX-100, T64297
3. DAPI Dihydrochloride, T19827; DAPI dilactate, T86160
4. Tween 20, T9526



免疫细胞化学 (ICC)

溶液和试剂配制

1. PBS缓冲液：用PBS粉末和ddH₂O配成。
2. 4%多聚甲醛：室温保存，使用前需37°C预热。
3. 0.5% TritonX-100溶液：用TritonX-100和PBS溶液配成，4°C保存。
4. 封闭液：即10%山羊血清，用山羊血清和PBS溶液配成，-20°C保存

实验操作流程

A. 细胞样本制备：

1. 贴爬片：取12孔板，在孔中央滴加20 μ L PBS溶液，夹取直径20 mm细胞爬片置于孔中，轻轻将爬片往下压，大气压作用使爬片紧紧贴合在孔板上，从而避免后续操作中爬片漂浮起来。
2. 洗涤爬片：向每孔加入1 mL PBS溶液，轻轻摇晃孔板，用真空泵将PBS彻底吸除。
3. 细胞种板：根据实验需要，向孔板中加入细胞悬液，培养细胞。

B. 固定：

1. 收细胞，吸除培养基，每孔加1 mL PBS溶液洗涤细胞，洗3次，每次3 min。
2. 每孔加入700 μ L 4%多聚甲醛，固定细胞10 min。
3. 用PBS洗涤3次，每次3 min。

C. 通透：

1. 加700 μ L 0.5% TritonX-100溶液，对细胞破膜30 min。
2. 用PBS洗涤3次，每次3 min。

D. 3%过氧化氢孵育：

1. 加700 μ L 3%过氧化氢溶液，孵育10 min，去除内源性过氧化物酶。
2. 用PBS洗涤3次，每次3 min。

E. 封闭：

每孔加入700 μ L封闭液，室温孵育45 min。

F. 一抗孵育：

1. 用封闭液配制一抗稀释液（抗体稀释度可参考产品网站）。
2. 吸除旧封闭液，每孔加入700 μ L一抗稀释液，4°C孵育过夜或室温孵育2.5 h。若4°C孵育，第二天孵育完成后应先让细胞室温复温30 min，再进行下一步骤。
3. 用PBS洗涤3次，每次3 min。

G. 二抗孵育：

1. 选择识别一抗种属的HRP偶联二抗，用封闭液配制二抗稀释液（抗体稀释度可参考产品网站）。



2、向细胞表面滴加700 μL二抗稀释液，室温孵育30 min。

3、用PBS洗涤3次，每次3 min。

H.显色：

配制DAB工作液，滴加400 μL到细胞上，显色1-3 min。DAB显色时，应持续观察细胞颜色，当细胞呈现棕黄色并颜色深度适中时，立即加入纯水，以终止显色。

I.苏木素染细胞核：

1、加入适量苏木素染液，不同苏木素所需染色时间在数秒至数分钟之间，建议先染几秒，再根据染色效果调整时间。

2、染色后迅速加入纯水洗涤，也可将12孔板放在细水流下冲洗，以去除残余染料（操作时避免水流直接冲洗细胞）。

J.脱水：

将细胞依次在85%乙醇、无水乙醇中浸泡3 min。

K.封片：

用镊子夹出细胞爬片，有细胞那面朝上放置，让爬片自然晾干。在载玻片上滴加适量中性树胶，将有细胞的那面爬片放置其上。操作时尽量避免气泡产生。待树胶晾干后，在显微镜下进行观察并拍照记录。

实验注意事项

1. 每孔中需加4%多聚甲醛、0.5% TritonX-100、3%过氧化氢、封闭液、抗体稀释液、DAB工作液和苏木素染液的体积并不固定，可根据具体实验情况调整。但加入的液体至少需要没过爬片，以防细胞干涸。
2. 封片之前的实验操作过程应始终保持细胞呈湿润状态。
3. TritonX-100溶液长时间静置后容易出现分层现象，使用前需上下颠倒，使溶液重悬。
4. 本操作步骤中的爬片需要满足：无菌并经过表面处理，适用于细胞培养。

实验相关产品推荐

1. 抗体：<https://www.targetmol.cn/all-antibodies>
2. TritonX-100, T64297
3. Tween 20, T9526

