

# 免疫荧光实验操作流程

## （细胞样本）

### 一、实验仪器及试剂

#### 1、实验器材

4℃冰箱、恒温恒湿箱、通风橱、移液器、避光孵育湿盒。

#### 2、实验试剂

① 缓冲液：0.01M pH7.2 TBS；0.01M pH7.2 TBST

| 试剂名称                     | 1*TBS/L | 试剂名称                     | 1*TBST/L |
|--------------------------|---------|--------------------------|----------|
| Tris                     | 1.21g   | 1*TBS                    | 1L       |
| NaCl                     | 8.8g    | Tween 20 溶液              | 0.001L   |
| 用稀 HCl 溶液和 NaOH 溶液调 pH 值 |         | 用稀 HCl 溶液和 NaOH 溶液调 pH 值 |          |

② 固定液：4%中性甲醛固定液（TBS 缓冲液配制）

③ 封闭液：5%空白山羊血清

④ 通透剂：0.3% Triton X-100（TBS 缓冲液配制）

⑤ 二抗：

Alexa Fluor 594-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)# AS074;

Alexa Fluor 488-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)# AS073;

Alexa Fluor 594-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L)# AS077;

Alexa Fluor 488-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L)# AS076;

⑥ 染核试剂：1mg/mL DAPI（用时使用 dH<sub>2</sub>O 配制）

⑦ 去离子水（dH<sub>2</sub>O）、抗荧光衰减封片剂。

### 二、实验步骤

#### 1、样本前处理

（1）弃去培养基，在细胞上缓慢加入常温 TBS，清洗 2 次，每次 5 秒；

（2）细胞固定：在细胞上覆盖 4%中性甲醛固定液（TBS 缓冲液配制），置于 4℃，固定 15min；固定液需足量；

(3) 固定液的清洗：去除固定液，使用 4℃ 预冷的 TBS 缓冲液，漂洗 3 次，每次 5 分钟；

(4) 通透（可选）：加入 TBS 缓冲液配制的 0.3% Triton X-100 室温孵育 10min，TBS 漂洗 3 次，每次 5 分钟（膜蛋白可省略细胞通透步骤）；

注意：需避免实验操作时温差过大或温度骤变；固定液需保证足量，可过量使用；甲醛有毒性，加固定液和固定后的清洗需在通风橱内操作。

## 2、染色步骤

(1) 封闭：用 5% 空白山羊血清将样本完全覆盖，切片需放置于湿盒内，细胞孔板可直接将孔板密封好，置于 37℃ 恒温恒湿培养箱孵育 30min；

(2) 一抗孵育：去除封闭液，直接在样本上滴加 TBS 缓冲液配制的一抗工作液，样本需完全覆盖，切片需放置于湿盒内，细胞孔板可直接将孔板密封好，置于 4℃ 孵育过夜；

(3) 复温：将样本置于常温，复温 15min，去除抗体工作液，用缓冲液 TBST 洗涤 1 次，5 分钟；用缓冲液 TBS 洗涤 3 次，每次 5 分钟；

(4) 二抗孵育：在样本上滴加与一抗种属对应的荧光二抗工作液，样本需完全覆盖，避光，37℃，孵育 1 小时；去除二抗工作液，用缓冲液 TBST 洗涤 1 次，5 分钟；用缓冲液 TBS 洗涤 3 次，每次 5 分钟；

(5) 染核：在样本上滴加 DAPI 工作液，使用 dH<sub>2</sub>O 配制，DAPI 溶液：dH<sub>2</sub>O 体积比 1:500，避光，室温，孵育 10 分钟；去除 DAPI 工作液，用缓冲液 TBST 洗涤 1 次，5 分钟；用缓冲液 TBS 洗涤 3 次，每次 5 分钟；

(6) 细胞孔板可直接加入抗荧光衰减封片剂后，于荧光显微镜下观察并采集图像；细胞涂片滴加抗荧光衰减封片剂，然后加盖盖玻片封片，再于荧光显微镜下观察并采集图像；细胞爬片可取出，盖在滴加抗荧光衰减封片剂的载玻片上后，于荧光显微镜下观察并采集图像。

注意：实验中，所有试剂滴加应准确、快速、足量，不能出现干片的情况；染色步骤从二抗孵育开始，后续所有步骤都需注意避光操作；染色完成后需及时观察并采集图像，避免干燥和荧光物质淬灭。