

免疫荧光实验操作流程（细胞样本）

一、实验试剂

(1) 缓冲液：0.01M pH7.2±0.2 TBS ； 0.01M pH7.2±0.2 TBST

(2) 固定液：4%中性甲醛固定液（TBS 缓冲液配制）

(3) 抗体稀释液：1X TBS、5% 山羊血清、0.3% Triton™ X-100

(4) 封闭液：5% 山羊血清

(5) 通透剂：100%甲醇

(6) 二抗（可选）：

使用兔源一抗可选二抗：

ABflo® 594-conjugated Goat anti-Rabbit IgG (H+L) (AS039)；

ABflo® 488-conjugated Goat anti-Rabbit IgG (H+L) (AS073)；

ABflo® 647-conjugated Goat anti-Rabbit IgG (H+L) (AS060)；

Cy3-conjugated Goat anti-Rabbit IgG (H+L) (AS007)

使用鼠源一抗可选二抗：

ABflo® 594-conjugated Goat anti-Mouse IgG (H+L) (AS054)；

ABflo® 488-conjugated Goat anti-Mouse IgG (H+L) (AS076)；

ABflo® 647-conjugated Goat anti-Mouse IgG (H+L) (AS059)；

Cy3-conjugated Goat anti-Mouse IgG (H+L) (AS008)

(7) 染核试剂：1mg/mL DAPI（用时使用 TBS 缓冲液配制）

(8) 去离子水（dH2O）、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），置于室温，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：对于细胞骨架，细胞器或细胞核定位蛋白，可增加通透步骤，使用冰甲醇冰上处理 5-10min(可选)；

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% 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°C** 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°C** 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 **2** 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°C**，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 **2** 次，每次 **5** 分钟；

(5) 染核：在样本上滴加 **1 μg/mL DAPI** 工作液，使用 **0.01M pH7.2 TBS** 缓冲液配制，**DAPI** 溶液：**TBS** 缓冲液体积比 **1:1000**，避光，室温，孵育 **30** 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 **2** 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。

免疫荧光实验操作流程（石蜡切片）

一、实验试剂

(1) 缓冲液：0.01M pH7.2±0.2 TBS ； 0.01M pH7.2±0.2 TBST

(2) 修复液（可选）：

pH6.0 0.01M 柠檬酸修复液（1L）：1.9mM C₆H₈O₇•H₂O, 10mM Na₃C₆H₅O₇•2H₂O, pH 6.0;

pH9.0 0.01M Tris-EDTA 修复液（1L）：10mM C₄H₁₁NO₃, 1.0mM C₁₀H₁₄N₂Na₂O₈•2H₂O, pH 9.0。

(3) 封闭液：5% 山羊血清

(4) 抗体稀释液：1X TBS、5% 山羊血清、0.3% Triton™ X-100

(5) 二抗：

使用兔源一抗可选二抗：

ABflo® 594-conjugated Goat anti-Rabbit IgG (H+L) (AS039);

ABflo® 488-conjugated Goat anti-Rabbit IgG (H+L) (AS073);

ABflo® 647-conjugated Goat anti-Rabbit IgG (H+L) (AS060);

Cy3-conjugated Goat anti-Rabbit IgG (H+L) (AS007)

使用鼠源一抗可选二抗：

ABflo® 594-conjugated Goat anti-Mouse IgG (H+L) (AS054);

ABflo® 488-conjugated Goat anti-Mouse IgG (H+L) (AS076);

ABflo® 647-conjugated Goat anti-Mouse IgG (H+L) (AS059);

Cy3-conjugated Goat anti-Mouse IgG (H+L) (AS008)

(6) 染核试剂：1mg/mL DAPI（用时使用 0.01M pH7.2±0.2 TBS 配制）

(7) 去离子水（dH₂O）、抗荧光衰减封片剂。

二、实验步骤

1. 水化/脱蜡：

(1) 烤片：将石蜡切片按同一朝向放置在切片架上，将其放入 55℃ 的恒温箱中烤片 30 分钟；同时将脱蜡液 1 缸一起放入 55℃ 的恒温箱中；

(2) 脱蜡至水：将石蜡切片连同切片架一起放入脱蜡液 1 缸中，再一起从恒温箱中取出置于常温，5 分钟后，将切片取出浸入到常温脱蜡液 2 缸中，并按照脱蜡

液 2、脱蜡液 3、无水乙醇 1、无水乙醇 2、95%乙醇、85%乙醇的顺序依次将石蜡切片放入缸中，**脱蜡液每缸 5 分钟，乙醇每缸 3 分钟**；用流水清洗切片 5 分钟。注意：流水清洗时水流不能直接对着切片；操作过程中需一直保持切片处于湿润状态。

2. 抗原修复：

(1) 方法一，微波热修复：将切片浸入盛有修复液的修复盒中，将抗原修复盒盖斜盖在修复盒上；整体放入微波炉中，高火加热 3 分钟后停火，微波炉内静置 5 分钟；再高火加热 3 分钟后停火，微波炉内静置 5 分钟；随后中低火加热 1 分钟后停火，微波炉内静置 5 分钟，然后将切片连同抗原修复盒拿出缓慢冷却至室温，用缓冲液 TBST 洗涤 3 次，每次 1min。

注意：修复液需完全浸没切片上组织；修复过程中严禁打开微波炉门；修复完成后不可快速冷却；修复液可根据实验需求自行换用其他类型修复液。

(2) 方法二，**高压热修复**：在高压锅中，加入 pH6.0 柠檬酸抗原修复液，高火预热；待修复液沸腾后将切片置于其中，并完全浸泡组织，盖好锅盖，扣上压力阀，高火继续加热；待限压阀开始转动喷气后调至中火，同时开始计时 **3.5 分钟**；计时结束后离开热源，自来水冲洗（约 15s），安全阀降落后开盖，待修复液温度降至室温后，用缓冲液 TBST 洗涤 3 次，每次 1min。

注意：修复液需完全浸没切片上组织；修复过程中严禁打开仪器或中断运行程序；修复液可根据实验需求自行选用修复液；修复时间可根据组织前处理状态适当调整。

3. 染色：

(1) 封闭：用 5% **山羊血清**将样本完全覆盖，切片需放置于湿盒内，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，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 **2 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 2 次，每次 5 分钟；

（5）染核：在样本上滴加 DAPI 工作液（1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ），使用 0.01M pH7.2 TBS 缓冲液配制，DAPI 溶液：0.01M pH7.2 TBS 缓冲液体积比 1:1000，避光，室温，孵育 30 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 2 次，每次 5 分钟；

（6）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。

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。