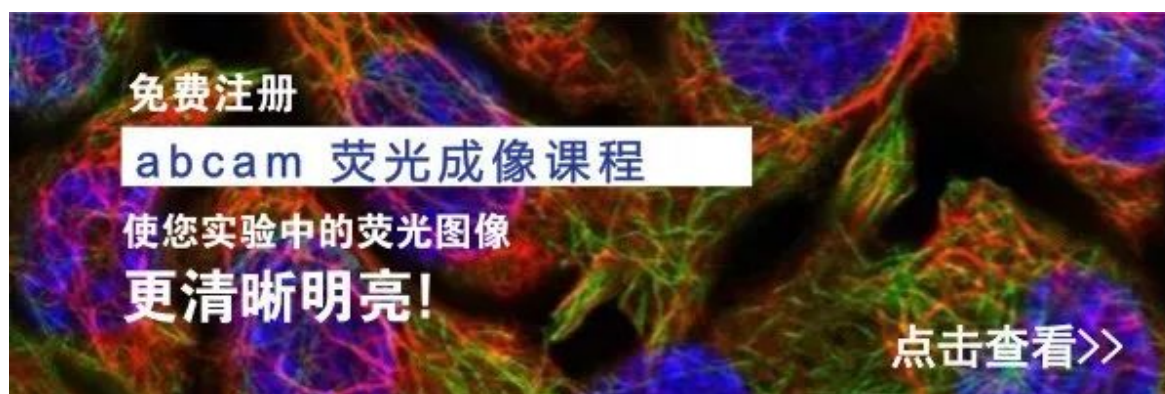


此为临时链接，仅用于预览，将在短期内失效。

免疫细胞化学 (ICC) 和免疫荧光 (IF) 实验方案

abcam abcam 2018-04-27

请关注：↑Abcam 助您更快实现研究使命



免疫细胞化学/免疫荧光 (ICC/IF) 是一种使用荧光抗体或染料来检测细胞内靶抗原的技术。本实验方案详述了使用 Cytospin™ 离心对悬浮细胞进行 ICC/IF 的流程。**建议收藏本文。**

一般流程

1. 用聚乙烯亚胺或多聚赖氨酸涂覆盖玻片，在室温下放置 1 小时。
2. 用无菌水充分漂洗盖玻片 3 次，每次 1 小时。
3. 充分干燥盖玻片，在紫外光下灭菌至少 4 小时。
4. 使细胞在玻璃盖玻片上生长，或制备 Cytospin 或涂片制备物。
5. 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 简单漂洗。

推荐使用 $1 \times \text{PBS}$ 0.1% Tween 20 作为洗涤缓冲液。

固定

可使用以下两种方法中的一种固定细胞：

1. 室温下，在 100% 甲醇 (-20 °C 冷冻) 中孵育细胞 5 分钟。
2. 室温下，在 4% 多聚甲醛 (溶于 PBS 中，pH 7.4) 中孵育细胞 10 分钟。用冰 PBS 洗涤细胞 3 次。

抗原修复 (可选步骤)

在抗原修复缓冲液对细胞进行加热处理后，有些抗体的效果会更好。查看产品信息，了解每种一抗的使用建议。

- 此为临时链接，仅用于预览，将在短期内失效！
1. 将抗原修复缓冲液（100 mM Tris, 5% [w/v] 尿素, pH 9.5）预热至 95 °C。具体方法为：将装有缓冲液的盖玻片染色缸置于水浴锅中，水浴锅的温度设为 95 °C。
 2. 用小型宽头镊子小心将盖玻片置于盖玻片染色缸内的抗原修复缓冲液中，记下长有细胞的盖玻片面。
 3. 在 95 °C 下加热盖玻片 10 分钟。
 4. 从抗原修复缓冲液中取出盖玻片，浸入 6 孔组织培养板内的 PBS 溶液中，保持长有细胞的一面朝上。
 5. 用 PBS 洗涤细胞 3 次，每次 5 分钟。
-

通透

如果靶蛋白位于细胞内，对细胞进行通透处理尤为关键。用甲醇固定的样品不需要进行通透处理。

1. 用 PBS（含 0.1–0.25% Triton X-100 或 100 µM Digitonin 或 0.5% Saponin）孵育样品 10 分钟。Triton X-100 是用于提高抗体渗透性最常用的去垢剂。但 Triton X-100 会破坏细胞膜，因此不适用于细胞膜抗原。
 2. 确定每种目标蛋白的 Triton X-100 最佳比例。
 3. 用 PBS 洗涤细胞 3 次，每次 5 分钟。
-

封闭与免疫染色

1. 用 1% BSA、22.52 mg/mL 甘氨酸的 PBST (PBS + 0.1% Tween 20) 孵育细胞 30 分钟，封闭抗体的非特异性结合（可替代的封闭液包括 1% 明胶或来源于产生二抗的物种的 10% 血清：查看抗体数据表了解相关建议）。
 2. 室温下，用稀释抗体（溶于 1% BSA 的 PBST 中）在湿盒中孵育细胞 1 小时，或 4 °C 过夜孵育。
 3. 倒出溶液，用 PBS 洗涤细胞 3 次，每次 5 分钟。
 4. 室温下，用二抗（溶于 1% BSA 中）避光孵育细胞 1 小时。
 5. 倒出二抗溶液，用 PBS 避光洗涤细胞 3 次，每次 5 分钟。
-

多色染色（可选步骤）

要检测同一个样品中两种或多种抗原的共同分布情况，需要使用双重免疫荧光流程。该流程可在混合物中同时进行检测，也可逐个抗原依次进行检测。

确保抗体来源于不同物种并且这些抗体有相应的二抗。例如，抗抗原 A 的兔抗体和抗抗原 B 的鼠抗体。也可使用偶联至不同荧光团的直标一抗。

同时孵育

1. 用封闭液孵育细胞 30 分钟。
2. 室温下，用两种一抗（溶于 1% BSA 的 PBST 中）在湿盒中孵育细胞 1 小时，或 4 °C 过夜孵育。

3.倒出溶液，用 PBS 洗涤细胞 3 次，每次 5 分钟。

此为临时链接，仅用于预览，将在短期内失效。

4.室温下，用两种二抗（溶于 1% BSA 中）避光孵育细胞 1 小时。

5.倒出二抗溶液，用 PBS 避光洗涤细胞 3 次，每次 5 分钟。

依次孵育

1.第一封闭步骤：室温下，用第一封闭液（来源于产生二抗的物种的 10% 血清）孵育细胞 30 分钟。

2.室温下，用第一种一抗（溶于 1% BSA 或 1% 血清的 PBST 中）在湿盒中孵育细胞 1 小时，或 4 °C 过夜孵育（一抗溶于 1% 明胶或 1% BSA 的 PBST 中）。

3.倒出第一种一抗溶液，用 PBS 洗涤细胞 3 次，每次 5 分钟。

4.室温下，用第一种二抗（溶于 1% BSA 的 PBST 中）避光孵育细胞 1 小时。

5.倒出第一种二抗溶液，用 PBS 避光洗涤细胞 3 次，每次 5 分钟。

6.第二封闭步骤：室温下，用第二种血清（来源于产生二抗的物种的 10% 血清）避光孵育细胞 30 分钟。

7.室温下，用第二种一抗（溶于 1% BSA 或 1% 血清的 PBST 中）在湿盒中避光孵育细胞 1 小时，或 4 °C 过夜孵育。

8.倒出第二种一抗溶液，用 PBS 避光洗涤细胞 3 次，每次 5 分钟。

9.室温下，用第二种二抗（溶于 1% BSA 中）避光孵育细胞 1 小时。

倒出第二种二抗溶液，用 PBS 避光洗涤细胞 3 次，每次 5 分钟。

如需检测两种以上的抗原，其余抗体按照步骤 1-5 继续操作。

复染

1.用 0.1-1 µg/mL Hoechst 或 DAPI（DNA 染色）孵育细胞 1 分钟。

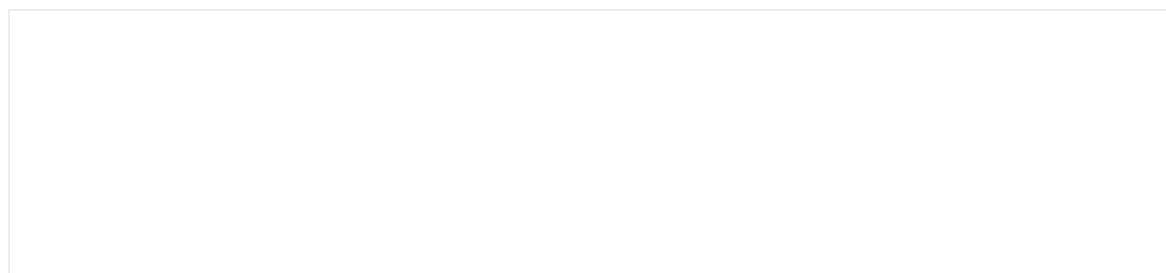
2.用 PBS 漂洗细胞。

封片

1.用一滴封片介质封闭盖玻片。

2.用指甲油密封盖玻片，避免样品变干和在显微镜下移动。

3.-20 °C 或 4 °C 下避光保存。



[阅读原文](#)

此为临时链接，仅用于预览，将在短期内失效。