

免疫荧光

1. 细胞准备

- 1.1 贴壁细胞：接种于爬片，PBS洗 3×5 min
- 1.2 悬浮细胞：细胞离心甩片机制备细胞片或直接制备细胞涂片

2. 固定

- 2.1 4%多聚甲醛固定15 min
- 2.2 PBS洗 3×5 min

3. 透化

- 3.1 0.1% Triton X-100处理8 min
- 3.2 PBS洗 3×5 min

4. 封闭

- 4.1 1% BSA室温封闭30 min

5. 孵育一抗

- 5.1 4°C过夜或室温1 h
- 5.2 PBST洗 5×3 min

6. 孵育二抗

- 6.1 室温避光孵育1 h或4°C过夜
- 6.2 PBST洗 5×3 min后蒸馏水漂洗一次

7. 核染色

- 7.1 DAPI用双蒸水稀释10倍后，染色10 min
- 7.2 蒸馏水漂洗一次

8. 封片拍照

- 8.1 载玻片滴加抗荧光淬灭剂，爬片细胞面朝下
- 8.2 避光保存，免疫荧光拍照

常见问题解析

1. 细胞透化后膜蛋白信号消失

问题原因：使用Triton X-100透化时破坏了细胞膜结构（尤其针对膜蛋白抗原如受体、通道蛋白）；透化剂浓度过高（ $>0.2\%$ ）或时间过长（ $>20\text{ min}$ ）。

解决方案：①更换透化剂：改用温和的 0.1% Tween-20（溶解脂质能力较弱）或皂苷（选择性穿孔）；②优化透化条件：降低Triton X-100至 $0.05\%-0.1\%$ ，缩短时间至 $5-10\text{ min}$ ；③免透化策略：对膜表面抗原直接跳过透化步骤，仅用 4% 多聚甲醛固定。

2. 多色荧光标记出现串色（Crosstalk）

问题原因：FITC（绿色）与TRITC（红色）的发射光谱部分重叠（ $520-620\text{ nm}$ ）；滤光片带宽设置过宽或未使用窄带通滤光片。

解决方案：①光谱分离设计：选择发射峰差距 $>100\text{ nm}$ 的荧光素组合；②顺序拍摄：按荧光波长从长到短依次拍摄，避免短波长激发干扰；③软件补偿：使用荧光显微镜的光谱解混功能（如Zeiss ZEN）扣除交叉信号细胞透化后膜蛋白信号消失。

3. DAPI染色过度掩盖目标信号

问题原因：DAPI浓度过高（ $>1\text{ }\mu\text{g/mL}$ ）或染色时间过长（ $>10\text{ min}$ ）；封片时未充分洗脱游离DAPI染料。

解决方案：①优化染色条件：将DAPI工作液稀释至 $0.1-0.5\text{ }\mu\text{g/mL}$ ，染色时间缩短至 $2-3\text{ min}$ ；②增加漂洗：DAPI染色后用PBS漂洗3次（非蒸馏水），彻底去除未结合染料；③核定位验证：若目标蛋白为核内抗原，改用Hoechst 33342（更低背景）或降低DAPI曝光时间。

参考文献

[1]Domenico FG, David JA. Immunofluorescence Microscopy [J]. Curr Protoc, 2023, 3(8): e842.