

## 免疫荧光（IF）实验操作流程

### 1. 试剂和溶液

10X PBS：80g NaCl，2g KCl，14.4g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 和 2.4g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 加 1L 纯水，调 pH 至 7.4

洗涤液：1× PBS：纯水稀释 10X PBS；1× PBST：含 0.05% Tween-20 的 1×PBS

固定液：4%多聚甲醛：4g 多聚甲醛溶于 100ml PBS

通透液：0.1% triton-100

封闭液：PBS 配制的 3% BSA

抗体稀释液：一抗稀释液：3% BSA；二抗及鬼笔环肽稀释液：1X PBS；DAPI: 纯水稀释

### 2. 实验步骤

1. 细胞爬片：将盖玻片在酒精灯上灼烧片刻灭菌，铺在 12 孔板中，然后接种细胞，置于 37°C，5% CO<sub>2</sub> 培养箱过夜，待细胞形态完全伸展开并且处于健康状态，细胞密度为 40%-50%（做爬片的细胞一般是复苏细胞传代 2 代后的细胞）；
2. 洗涤：倒掉细胞培养液，1×PBS 轻微振荡洗涤 2 次,每次 5min；
3. 固定：4%多聚甲醛固定细胞，室温放置 20min,倒掉多聚甲醛，加入适量 PBS；
4. 冻存：-20°C 保存（如果直接使用，可跳至 7）；
5. 解冻：常温下放置 30 min；
6. 洗涤：PBS 轻微振荡洗涤 2 次,每次 5min；
7. 通透：加入适当体积的通透液室温放置 10min。（若蛋白为膜表达则无需此步）
8. 洗涤：PBS 轻微振荡洗涤 2 次,每次 5min；
9. 封闭：加入适当体积的封闭液，室温放置 30 min；
10. 一抗孵育：倒掉封闭液，加入适当体积及浓度的一抗，37°C 孵育 60min；
11. 洗涤：PBST 轻微振荡洗涤 3 次,每次 5min；
12. 二抗孵育：加入适当体积及稀释比的荧光二抗，37°C 避光孵育 50 min；（如果一抗是荧光素标记的则无需此步）；
13. 洗涤：PBST 轻微振荡洗涤 3 次,每次 5min；
14. 核染色：加入适当体积及稀释比的核染料 DAPI 室温反应 10min（如果无需加鬼笔环肽，可洗涤后





跳至 16);

15. 洗涤：PBST 轻微振荡洗涤 3 次,每次 5min；
16. 细胞骨架染色 :此步骤只针对有细胞核定位的项目 ;加入反应体积为 0.2ml ,适当稀释比的鬼笔环肽 ,  
避光 37°C 孵育 60 min 或 4°C 孵育过夜；
17. 洗涤：PBST 轻微振荡洗涤 2 次,每次 5min , 纯水轻微振荡洗涤 5min；
18. 封片：取干净的载玻片，分别标记和编号，在载玻片上滴加适量防荧光猝灭封片剂，用镊子取出盖玻片，细胞面朝下，盖在载玻片上；
19. 荧光显微镜观察，记录结果。

