

# 细胞固定与免疫荧光

细胞固定是在短时间内保留细胞当前状态的实验操作, 是免疫荧光等实验的关键步骤。本 Protocol 是实验室的保留 Protocol

## 多聚甲醛固定细胞

1. 提前配置: 6 孔板每孔需要 2.5 mL 8%/4% PFA, 1 mL 0.5% Triton+PBS
  - ! PFA 有毒操作时应避免与皮肤接触, 必要时戴口罩, 其溶解需要在 65°C 水浴或烘箱中过夜, 配制好的 PFA 水溶液可以 2-3mL 分装, -20°C 保存
  - 8% PFA: 15 mL PBS + 1.2 g PFA (50mL 管配置, 封口膜, 避免 PFA 洒出)
  - 4% PFA: 15 mL PBS + 0.6 g PFA 或 40 mL PBS + 1.6g PFA
  - 0.5% Triton X100+PBS: 200 mL PBS 中加入 1 mL Triton, 搅拌过夜, 室温保存
  - 1 mg/mL NaBH<sub>4</sub> in PBS (可选)
2. 直接倒掉培养基, 沿壁加入 2 mL 4% PFA, 室温低速 rotor 固定 20 min  
或者保留 1 mL 培养基, 兑入 1 mL 8% PFA, 室温低速摇晃固定 20 分钟 (期间可以在与固定完成后换为 4% PFA)
3. 倒掉 PFA 固定液, 在纸上控干, 沿壁加入 2 mL 0.5% Triton X100 打孔, 方便抗体或荧光染料进入细胞内, 室温低速 rotor 5 min
4. 倒掉 0.5% Triton X100 后, 2 mL PBS 洗 3 次, 每次摇床摇晃 5 min
5. 此时的玻片有如下几种操作
  - 保存: 放 4°C 冰箱, 长时间放置的话放 4 μL 10% 叠氮化钠(500×, 0.02% 浓度使用)
  - 抗体荧光: 按照抗体使用浓度, 3% BSA 稀释一抗, 每张片子 25 μL 抗体稀释液点在 Parfilm 膜上, 玻片倒扣, 避免气泡, 4°C 过夜标记; 次日每孔每次 2 mL PBS 洗 3 次, 每次 5 分钟, 后避光标记 2 抗 1 小时(标记方法同一抗, 1:500 使用荧光二抗), 避光 PBS 洗 3 次
  - DAPI: DAPI 取出后冰上融化, 使用 PBS 以 1:10000 比例稀释 DAPI, 稀释液每孔加入 2 mL 室温摇床 10 分钟
6. (可选步骤) 使用 1 mg/mL NaBH<sub>4</sub> 处理细胞 5 分钟, 淬灭自发荧光, 后使用 PBS 漂洗
7. 封片: 将泡在酒精中的载玻片用粗镊子取出, 用卫生纸上吸走多余的液体, 在载玻片上滴上 15 μL 的 Mowoil 或 DAPI-Mowoil (18mm 圆片子), 在将固定的细胞扣到载玻片上, 注意位置, 避免气泡, 使用滤纸吸干多余的封片剂
8. 室温避光晾干凝固至少 1 小时, 待玻片干了之后在周围涂上指甲油, 减小遮盖, 注意均匀
9. 用棉签沾去离子水和酒精擦干净盖玻片, 4°C 冰箱保存或直接镜检

## 冰甲醇固定

1. 用 1 mL PBS 涮洗培养基两次, 用手轻轻摇晃, 倒掉后纸上倒扣, 除尽残液
2. 沿侧壁缓慢加入 1-2 mL 冰甲醇至孔板中, 静置 5 min  
.....  
! 冰甲醇是常年-20°C保存, 使用前可以提前 3 分钟左右取出
3. 倒扣孔板去除冰甲醇, 用纸板迅速扇至冰甲醇挥发, 玻片发白, 晾孔板 10min  
! 此步骤也可以直接用 PBS 洗三次去除甲醇
4. 晾干后在孔板中加入 1 mL PBS, 使得玻片复水
5. 类似 PFA 固定的步骤 5, 进行荧光的染色或保存
6. 在载玻片上点上 15  $\mu$ L 的 Mowiol 或 Mowiol DAPI, 将玻片扣至该液体上, 不要有气泡
7. 避光晾干, 涂指甲油封片

### 关于冰甲醇固定

- 冰甲醇固定的样品细胞不宜太密, 否则固定后细胞飘得很严重, 六孔板 $1.5 \times 10^6$ 为宜
- 冰甲醇具有打孔的作用, 因此通常不需要额外的打孔, 只有在针对一些内层不好标记的蛋白时, 可以使用 0.5% Triton 对胞质进行抽提
- 冰甲醇会对细胞核、**微丝**产生影响, 观察这些标记物时, 尽可能避免使用甲醇固定剂

## 3% BSA 的配制和稀释

- 配制: 溶解 3 g BSA 到 100 mL PBS 中, 1 mL 分装, -20°C保存
- BSA 样品的稀释、制样(500 $\mu$ L)

浓度	3% BSA	PBS
3 mg/mL	50 $\mu$ L	450 $\mu$ L
1 mg/mL	16.7 $\mu$ L	483.3 $\mu$ L
0.5 mg/mL	8.3 $\mu$ L	491.7 $\mu$ L
0.2 mg/mL	3.3 $\mu$ L	496.7 $\mu$ L

配制后加入 500  $\mu$ L 2 $\times$ SDS Sample Buffer(加入 Sample Buffer 后浓度稀释一倍, 但是样品同样会稀释, 即可直接进行比较)

在 SDS-PAGE 时, 乘以上样量的一半, 标注蛋白的总量

修订日期 2024-04-23