

# Fix and stain

dye or antibody	suggested starting dilution
dyLight secondary	1:500
TxRed or Alexa405 secondary	1:300
Alexa647 secondary	1:400
DAPI	1:10,000
Phalloidin - Alexa 488	1:2000
Phalloidin - Alexa 561	1:1000
Phalloidin - Alexa 647	1:300

## 一个简单的细胞染色全过程

观察Hela细胞的细胞核和微丝细胞骨架>>

## 三维样品的染色

建议在熟练掌握盖玻片上样品的染色方法后，再进行三维样品的染色。操作过程中涉及换液，务必缓慢，避免液流直接冲刷样品。

1. 吸弃培养液，加入4% PFA，室温下摇床缓慢地固定30 min。不需要使用Kerb's的PFA，因为三维样品太复杂，没有必要担心固定对单细胞中亚细胞结构形态的影响。
2. PBS快速润洗3次，再摇床润洗2次，5 min/次。
3. 弃PBS，加入PFS，室温摇床30 min；通过saponin穿膜实现给样品打孔。

### PFS (add $\text{NaN}_3$ for extended storage)

0.35 g	sigma fish skin gelatin
0.125 ml	10% saponin stock
To 50 ml	1x PBS

1. PFS稀释一抗：按每个孔 (one well of an 8-well chambered coverglass) 加入0.4 ml的终体积配制；4℃摇床孵育过夜。
2. PFS快速润洗一次，然后润洗3次，10 min/次。
3. PFS稀释二抗（一般为1:400）；4℃摇床孵育过夜。
4. PFS快速润洗一次，然后润洗3次，10 min/次。
5. 可在PFS中上镜观察；如果自发荧光，可用PBS清洗后在PBS内观察。不观察时，parafilm包裹避光存4℃。

建议及时观察；加二抗后需要用铝膜包裹来保护荧光信号（如果是荧光蛋白，则固定样品后就要注意避光了）。

## 盖玻片上样品的染色

1. 将目的细胞准备成合适浓度的细胞悬液。
2. 将coat好的盖玻片（具体请看[coat coverslips](#)>>）放入多孔板（需根据盖玻片大小和形状选择使用6孔或12孔板），并确保其贴附底部。
3. 将细胞悬液从上方加入12孔板；若为6孔板，可先加入1毫升细胞培养液浸没盖玻片和孔底部，然后加入细胞悬液并打匀。
4. 37℃培养，使细胞贴壁；按经验需要至少1小时。转移多孔板到培养箱时，不要震动多孔板，避免出现细胞的不均匀贴壁。
5. 根据实验需要，选择不同贴壁状态的细胞，轻轻吸去培养液（此时细胞已经贴在盖玻片的一侧），加入4度的4% **paraformaldehyde fixation buffer**>>，在室温固定10分钟。若是需要染微管结构，需要使用37度的固定液，避免低温导致的微管的解聚。某些抗体，需要使用100%的甲醇进行二次固定。
6. 固定完成后，吸去固定液（如有条件，需用专用容器盛放已使用的固定液并做后期无毒处理）；PBS润洗。之后所有步骤需密切关注盖玻片的细胞面，确保充分的湿润，即使微量的干涸都会导致细胞形态的严重变化。
7. 可选：取指甲盖大小的 $\text{NaBF}_4$ 于EP管中，加入1毫升PBS，此时溶液中会产生大量气泡（注意不要盖盖子，以免崩开）。用尖头镊子和略弯的针头把盖玻片从多孔板中取出放到staining chamber上，注意有细胞的面朝上。迅速的，在盖玻片上加150微升含 $\text{NaBF}_4$ 的PBS，反应5分钟。
8. 用尖头镊子和针头把盖玻片转移到washing rack上，注意细胞面朝一个方向，用PBS浸泡5分钟。更换PBS两次以上；若使用了 $\text{NaBF}_4$ ，需至溶液中不再有气泡。固定好的盖玻片，在PBS中，可放置4℃短暂保存。
9. 把盖玻片放回staining chamber上（注意细胞面朝上），加150微升0.1% Triton X-100 in PBS，室温处理5分钟。此步骤需严格控制时间，用于在细胞膜上穿孔帮助染料/抗体进入细胞。Triton处理后，水分极易流失，需要确保细胞面充分的湿润。
10. 把盖玻片转移到washing rack上，用PBS浸泡5分钟，而后更换PBS两次以上。
11. 把盖玻片放回staining chamber上，每片盖玻片上加上100微升由150  $\mu\text{l}$  10% BSA in PBS, 5  $\mu\text{l}$  goat serum, 45  $\mu\text{l}$  PBS混合成的溶液，孵育至少15分钟——减少后续步骤使用的荧光二抗的非特异性吸附（若使用donkey的二抗，需使用donkey serum而非goat serum进行封闭）。
12. 把盖玻片转移到washing rack上，用PBS浸泡清洗一次。

13. 一抗用1% BSA in PBS稀释，不同抗体/染料的参考稀释比例见上表。把盖玻片放回staining chamber上，每片盖玻片上加90微升稀释好的抗体/染料，4度孵育过夜，或者室温避光孵育至少1小时。建议在staining chamber里放一块含水的纸团或者脱脂棉，提高内部的湿度以减缓盖玻片上液体的蒸发。
14. 把盖玻片转移到washing rack上，用PBS浸泡5分钟；然后更换PBS，浸泡清洗两次。清洗一抗的步骤需要彻底，充分的浸泡清洗才能降低non-specific antibody binding。如果使用了DAPI或类似的细胞核染料，建议及时、彻底地清洗washing rack和玻璃容器，避免干扰下一次的染色。
15. 荧光二抗用1% BSA in PBS 1:500稀释。把盖玻片放回staining chamber上，每片盖玻片上加90~100微升稀释好的抗体，室温避光孵育1小时。如果需要4度孵育过夜，请使用1:1000或者更高倍数稀释了的荧光二抗。建议在staining chamber里放一块含水的纸团或者脱脂棉，提高内部湿度以减缓盖玻片上液体的蒸发。
16. 把盖玻片转移到washing rack上，用PBS浸泡5分钟；然后更换PBS，浸泡清洗至少三次。清洗二抗的步骤需要彻底，充分的浸泡清洗才能降低background fluorescence。
17. 可选：把盖玻片放回staining chamber上，每片盖玻片加150微升的4% paraformaldehyde fixation buffer>>，在室温再次固定10分钟。然后重复NaBF<sub>4</sub>的处理和PBS清洗。
18. 用kimwipes擦拭载玻片的两面（国产载玻片的清洁做的差，建议擦拭前过一下火焰，而后再擦拭），在载玻片中央加3-5微升mounting medium>>。用镊子夹起盖玻片，尽量吸去盖玻片无细胞面的PBS。把盖玻片慢慢放到载玻片的推平的mounting medium>>上（注意细胞面朝下）；缓慢放下，使盖玻片内尽量无气泡。避光静置，等mounting medium>>固化或粘稠；不要急急地进入下一步，会导致玻片，彻底损坏样品。
19. 在盖玻片四周点少许指甲油，避光处风干，以彻底固定盖玻片的位置。指甲油干后，用kimwipes蘸少许DI水擦去盖玻片上残留的PBS。
20. 显微镜观察。若使用油镜，需要避免显微镜用油接触干了的指甲油。
21. 油镜观察后的片子，如果需要长期保存，可以使用少量石油醚洗去在盖玻片上的油；不建议干擦盖玻片上的油，容易滑动盖玻片，破坏样品。

by wj, lc

Categories>>: [Lab>>](#) | [Library>>](#)