

# 免疫荧光的雷区该如何避免？

转自: [细胞之邦](#)

今天实验室的一位小姐姐拉着我的手跟我哭诉道 :免疫荧光实在是太容易失败了！

我只是想要一个稳稳的成果啊！怎么这么难呢！

现在就给大家分享该如何避免免疫荧光的雷区。

## 一、实验的常用方法有直接法和间接法，方法的选择是实验的第一步：

方法	直接法	间接法
步骤	将荧光标记的特异性抗体（抗原）直接加在抗原（抗体）上，经一定的温度和时间染色，水洗—干燥—封片—镜检	先用已知未标记的特异性抗体（一抗）与抗原反应，再用标记的抗体（二抗）与其反应，形成抗原—抗体—抗体复合物，水洗—干燥—封片—镜检
优点	操作简便、特异性高、非特异性染色少	敏感性高，目前多采用间接法
缺点	敏感性低	操作复杂

## 二、我们来看看实验的常见问题：

### 1、整个细胞片都出现荧光亮点？

答：原因有二：一是二抗浓度过高，适当降低二抗浓度即可。

二是二抗发生沉淀，可以使用过滤或者离心荧光标记二抗

### 2、信号弱或无信号，染色细胞过少？

原因	优化方案
目标蛋白在细胞中没有表达	制备细胞裂解液，用 Western Blotting 验证目标蛋白在细胞中是否表达
表达目标蛋白的细胞过少	标本中使用更多的细胞，试用其他瞬时转染方法，或者使用稳定转染细胞系
细胞通透性差	增加通透剂作用的时间或者浓度，或改用其它的通透剂
染色前的固定步骤破坏了抗原表位	改用其他固定方法
通透使抗原丢失	减少通透剂作用的时间或强度
抗体不识别	换用其他抗体
一抗稀释度过大	同一样品按最佳的二抗用量作一抗稀释曲线，以确定最佳的一抗稀释比例
二抗选择错误	使用正确的二抗

### 3、为什么我的镜下观察只有 DAPI 的蓝光，目的荧光几乎没有或者很弱？

答：出现这种现象很有可能是抗体比例太低，需提高抗体浓度，可配合提高二抗浓度；共聚焦的激发荧光强度不够大；二抗孵育时是否是对应的种属，比如本来需要山羊抗鼠结果加为山羊抗兔

### 4、为什么我的细胞核周围总是存在有一些蓝色的小点点？

答：此种情况一般是支原体污染所致，建议用杀支原体药 2 周后再检测，或者通过提高共聚焦机器背景值来覆盖支原体荧光

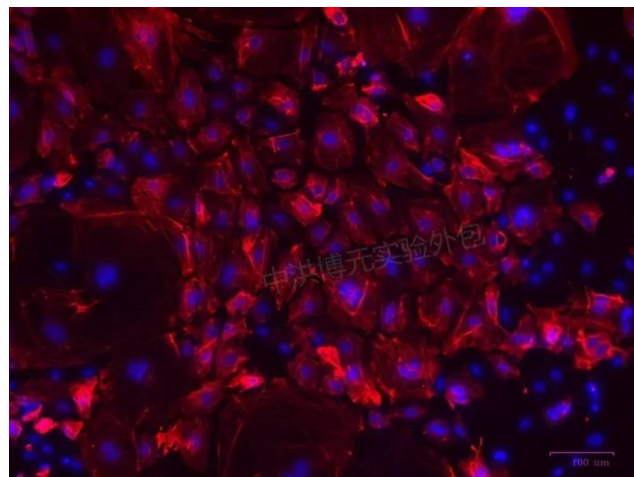
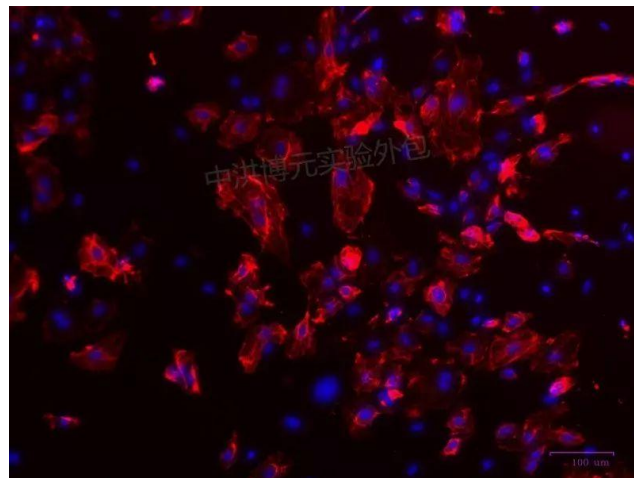
### 5、共定位的视野该如何选择？

答：共定位时，首先判断哪些细胞是转染成功的，比如我过表达了蛋白 A，想做蛋白 A 和蛋白 B 的共定位关系，则在视野中寻找已成功转染蛋白 A 的细胞，一般荧光强度会显著高于周边其他细胞，再在这个细胞上观察蛋白 B 的表达，

### 6、视野中细胞与细胞之间存在散在的发光点。

答：有两种情况可造成：1，拍照时 PBS 量过少引起的非特异性；2，PBS 未过滤，未溶解的残渣黏附而导致

**成功免疫荧光如下图：**



### **三、除此之外，这些注意事项也要牢记**

#### **1、合适的抗体稀释比例**

通过优化抗体稀释比例来优化染色，通常情况下 1ug/ml 的纯化抗体或者 1:100-1:1000 的抗血清足够达到特异性染色的结果。但在能保证低背景染色的前提下，可以通过增加浓度来提高信号强度。如果是第一次使用该抗体或测定某抗原，强烈建议浓度梯度实验。

#### **2、抗体特异性**

免疫荧光需要用到特异性非常强的抗体，可以避免高背景和不理想的蛋白定位结果。在大多数情况下，纯化抗体的效果很好，但是正确的对照可以帮助精准定位抗原。使用只有二抗染色的片子

#### **3、细胞固定和通透**

为达到最佳的检测效果，细胞需要经过固定和通透。这些步骤非常关键，细胞和抗原需要保证最佳的结构，并利于抗体与抗原结合。通常情况下，需要通过以下步骤得以实现：细胞用 2%-4%多聚甲醛固定，之后用 0.1%皂角苷或 0.02%的 Triton X-100 进行通透。前者是比较温柔的处理，但是对于核内抗原可能无效，需要用到 Triton。使用皂角苷进行通透时，要注意它会引起细胞膜的可逆性通透，也就是除了在通透初期，在每个抗体孵育环节都需要进行通透。另外，细胞可以用冰甲醇进行同时固定和通透，可以避免去垢剂的使用。

#### **4、封闭条件的优化选择**

为了防止内源性非特异性蛋白抗原的结合，需要在一抗孵育前用封闭液封闭，这样可以减少非特异性的背景着色。封闭液可以选择二抗来源一致的血清，一般来说，血清价格比较昂贵，可以用 1%-5%BSA 替代，BSA 可以说是万能的封闭血清。另外封闭时间不易过长，30-60min 即可，且封闭后不用洗涤，直接加一抗孵育即可。

## **5、一抗二抗的选择**

封闭过后需要一抗孵育，可以选择 4 度过夜孵育或者室温 3h，以笔者的经验是一抗孵育 4 度过夜比较好，抗原抗体结合会比较充分。一抗二抗的稀释比例可以根据抗体说明书来，再根据自己具体的实验要求进行优化。如果抗体浓度过低，会造成信号太弱，如果抗体浓度过高可能会造成背景染色太强。荧光二抗个人感觉 Alex flour 荧光基团信号强于 Dylight 强于 FITC。如果做免疫双标，一抗要来自不同种属，荧光二抗的光谱也要分开。