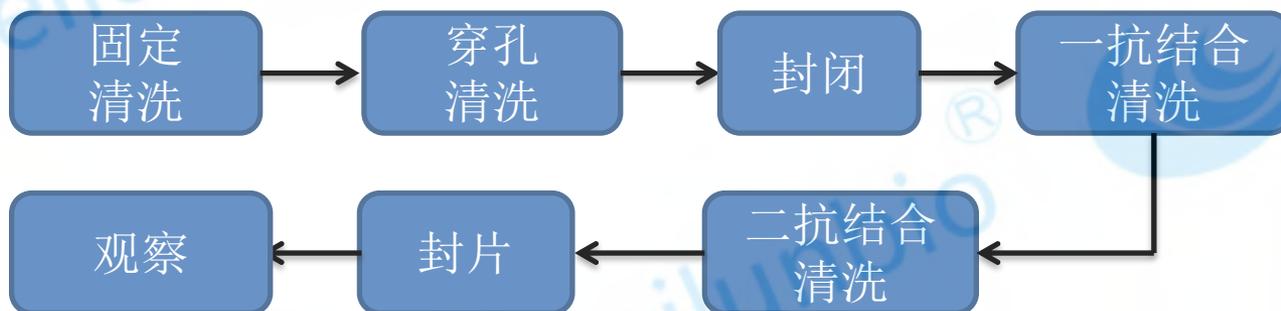


细胞蛋白荧光标记知识培训

一. 细胞荧光标记

(一) 固定穿孔后进行细胞荧光标记-以细胞原位的免疫荧光标记为例



1、试剂准备：固定液（4%多聚甲醛）、穿孔液（含0.1%TritonX-100的PBS溶液）、封闭液、PBS、PBST溶液、一抗、荧光二抗

2、操作过程：

1) 细胞爬片或直接在孔板中进行固定操作。

2) 固定细胞：4%多聚甲醛，室温下固定30分钟。

注意：固定时间可延长但不可少于30分钟。

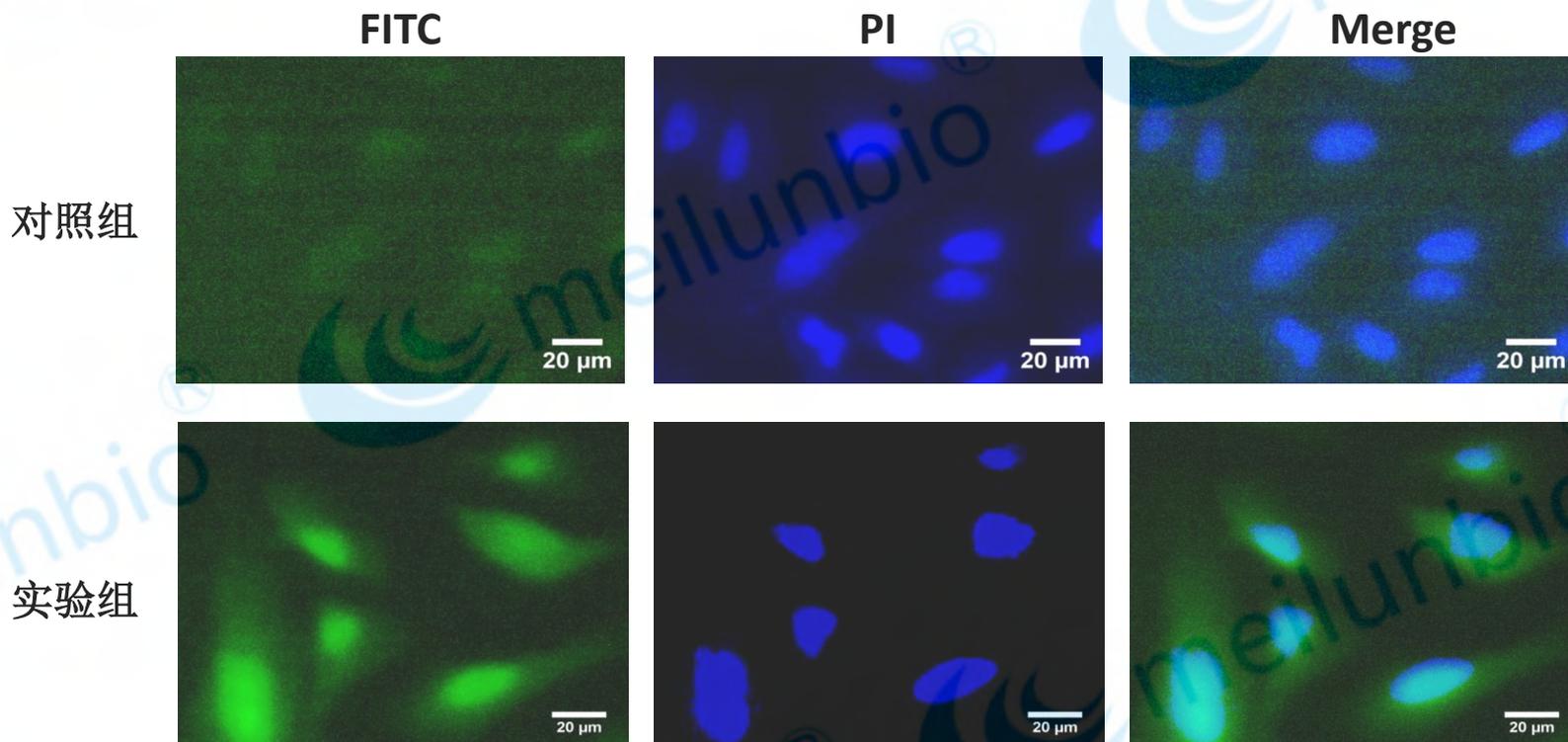
3) 清洗：PBS清洗3次，每次5分钟。

注意：多聚甲醛一定要清洗干净，否则会对后面抗体标记有影响。

4) 穿孔：0.1% TritonX-100室温下作用7分钟。

5) 清洗：PBS清洗3次，每次5分钟。

- 6) 封闭：使用封闭液对细胞进行封闭，一般为30分钟。
- 7) 一抗结合：室温孵育1小时或4℃孵育过夜。PBST清洗3次，每次5min。
- 8) 二抗结合：间接免疫荧光需要使用二抗，室温避光孵育1小时。PBST清洗3次，每次5min。
- 9) 封片及检测：滴加封片剂1滴，封片，荧光显微镜观察。（参考MA0235）



结果展示图:A549细胞爬片的GAPDH免疫荧光标记实验。一抗为GAPDH；二抗为FITC-IgG(goat anti-rabbit)（通过MA0362-快速FITC 抗体(蛋白)标记试剂盒实现）。图中伪彩绿色代表GAPDH信号，蓝色代表PI标记的细胞核。

（二）无需固定穿孔的细胞荧光标记（包括活细胞、死细胞标记）

以Calcein-AM/PI双染进行细胞活力检测为例：

1.染色工作液的配制：

Calcein-AM 和PI 推荐浓度范围为0.1~10 μ M，可以根据步骤一确定的最佳浓度来配制工作液。使用PBS缓冲液稀释染料母液至所需浓度作为染色工作液。

2.细胞染色

对于贴壁细胞：

- 1) 可以将细胞接种至细胞培养板、微孔板或者制作成细胞爬片。悬浮细胞也可制作成细胞爬片。
- 2) 用PBS 温和洗涤细胞2-3 次，确保除去培养基中含有的活性酯酶。
- 3) 加入足量的染色工作液，保证没过单层细胞。
- 4) 在37 $^{\circ}$ C 孵育15~30 分钟。

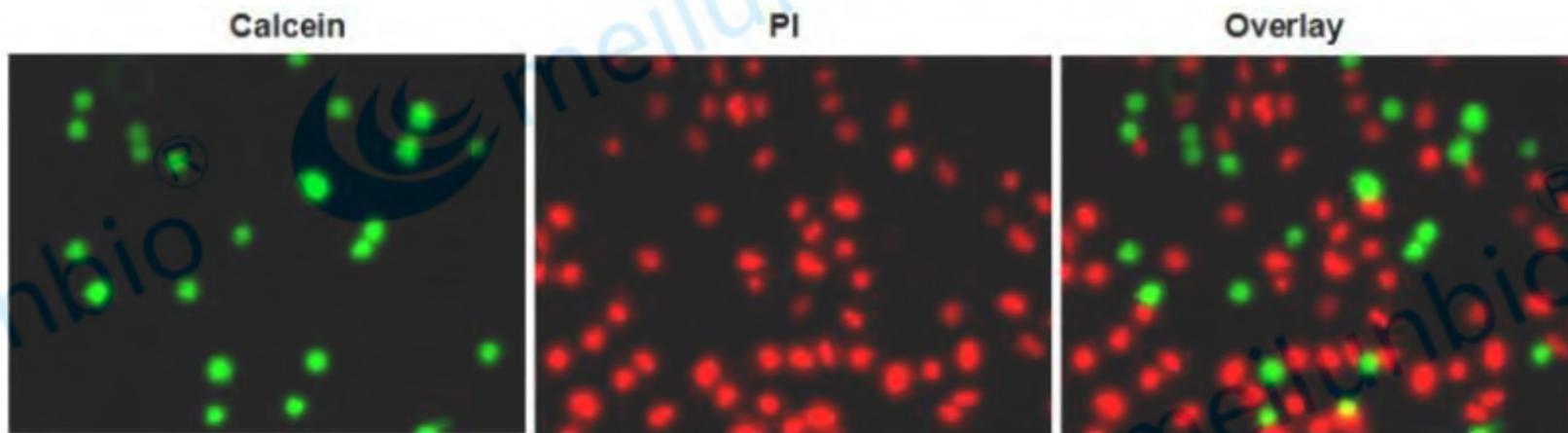
对于悬浮细胞：

- 1) 按照实验要求处理细胞后，1,000 rpm，3 min 离心收集细胞(10^4 - 10^5 cells)。
- 2) 去除上清，PBS 重悬洗涤2-3 次，确保除去培养基中含有的活性酯酶。
- 3) 用100 μ l 染色工作液重悬细胞，使细胞密度大约为 10^5 - 10^6 cells/ml。
- 4) 在37 $^{\circ}$ C 孵育15~30 分钟。

3. 荧光显微镜检测:

1) 贴壁细胞: 对于培养板孔中的细胞: 吸出染色工作液终止孵育, 加入10 μ l PBS, 覆以干净的盖玻片。对于细胞爬片: 在干净的载玻片上滴加10 μ l 的PBS, 覆以细胞爬片。以封片剂 (货号: MA0235) 封片, 防止水份蒸发。悬浮细胞: 在干净的载玻片上滴加适量的染色的细胞溶液, 覆以盖玻片。以封片剂 (货号: MA0235) 封片, 防止水份蒸发。

2) 在荧光显微镜下使用490 \pm 10 nm 激发波长下同时观察活细胞 (黄绿色荧光) 和死细胞红色荧光)。另外使用545 nm 激发波长单独观察死细胞。



结果展示: HeLa细胞经Apoptosis Activator 2 (货号: MB4124) 凋亡处理后, 进行Calcein-AM/PI双染 (货号: MA0361)。检测工作浓度: 2 μ M calcein AM, 8 μ M PI; 孵育时间: 40 min; 活细胞细胞质成绿色荧光, 死细胞细胞核呈红色荧光, 颜色鲜明。

- 更多产品内容请参考 “[细胞蛋白荧光标记活体成像产品选择指南](#)”

二. 蛋白荧光标记

以FITC 标记抗体(蛋白)为例:

A. 蛋白质制备

用标记缓冲液（50mM硼酸钠）将蛋白浓度调节至 $\leq 2\text{mg/mL}$

注意：蛋白质必须在不含铵离子或伯胺（例如Tris或甘氨酸）的缓冲液中。如有必要，用50mM硼酸钠通过透析置换缓冲体系。

B. 蛋白质标记

1. 用DMSO溶解标记染料-FITC，FITC浓度为10mg/ml。

注意：FITC必须完全充分溶解才能进行有效标记。

2. 向制备的0.5mL蛋白质溶液（浓度 $\leq 2\text{mg/ml}$ ）中加入5ul 的FITC溶液（10mg/ml），上下晃动并短暂涡旋混匀。短暂离心，使样品汇集到收集管底部。

3. 将反应混合物在室温下避光孵育60-120分钟。

c.蛋白质纯化

- 1.将两个微型离心型纯化柱底部的塑料塞拧下后，置于2ml收集管中。
- 2.混合纯化树脂以确保均匀悬浮，并将600uL悬液分别加入两个离心型纯化柱内，可以通过弹击管壁的方法去除气泡。以 $\sim 1,000 \times g$ 离心30秒以除去储存溶液。
- 3.重复步骤2，丢弃用过的收集管并将柱子放入新的2ml圆底离心管中。
- 4.向每个旋转柱中各加入250-270 μ L标记反应物，注意不可吹起树脂。
- 5.以 $\sim 1000 \times g$ 离心柱30-45秒以收集纯化的蛋白质。合并两个离心管中的样品，并丢弃使用过的离心柱。
- 6.向标记的蛋白质添加1%(w/v) BSA和0.02%(w/v)叠氮钠在4° C下避光可保存长达一个月。或者将标记的蛋白质一次性分装避光储存在-20° C，避免反复冻融。

D. FITC与蛋白质比率计算

1. 使用PBS对FITC标记物进行稀释，测量吸光度A280和 A495

$$\text{Molar F/P} = \frac{2.77 * A_{495}}{A_{280} - (0.35 * A_{495})} \text{ (仅适用于FITC-IgG标记产物)}$$

$$\text{IgG (mg/ml)} = \frac{A_{280} - (0.35 * A_{495})}{1.4} \text{ (仅适用于FITC-IgG标记产物)}$$

其中1.4 是大多数IgG在浓度为1.0 mg/ml (pH 7.0) 的A280

2. 当用于除IgG以外的蛋白质标记，可以参考下列公式进行计算：

$$\text{Molar F/P} = \frac{\text{MW}}{389} * \frac{A_{495}/195}{A_{280} - [(0.35 * A_{495})] / E_{280}^{0.1\%}} = \frac{A_{495} * C}{A_{280} - (0.35 * A_{495})}$$

其中， $C = \frac{\text{MW} * E_{280}^{0.1\%}}{389 * 195}$ (C 是对某一蛋白质特有的常数)

MW 标记蛋白质相对分子质量.

389 FITC相对分子质量

195 结合 $E_{280}^{0.1\%}$ 的FITC在pH=13.0时的 A_{495}

$A_{280} - (0.35 * A_{495})$ 是对A280的吸光度校正

$E_{280}^{0.1\%}$ 标记蛋白质在浓度为1.0 mg/ml的 A_{280} 。

美仑

进口品牌



	A280(30x)	A495(30x)	F/P	C(mg/ml) x30
Thermo组	0.18	0.012	0.189	3.76
美仑组	0.213	0.142	2.4	3.5

结果展示图： 通过美仑MA0362-快速FITC 抗体(蛋白)标记试剂盒与进口品牌FITC 标记抗体流程及结果对比。美仑标记的FITC-IgG的F/P=2.4，好于进口品牌（0.189），并且在规定范围内，而且蛋白收率与进口品牌相当。

- 以上蛋白荧光标记的操作方法还适用于于Alexa Fluor NHS Ester系列染料，更多产品内容请参考“[细胞蛋白荧光标记活体成像产品选择指南](#)”

MB0269	Alexa Fluor 514 NHS Ester (Succinimidyl Ester)
MB0270	Alexa Fluor 633 NHS Ester (Succinimidyl Ester)
MB0260	Alexa Fluor 555 NHS Ester (Succinimidyl Ester)
MB0272	Alexa Fluor 405 NHS Ester (Succinimidyl Ester)
MB0273	Alexa Fluor 568 NHS Ester (Succinimidyl Ester)
MB0278	Alexa Fluor 647 NHS Ester (Succinimidyl Ester)
MB0279	Alexa Fluor 700 NHS Ester (Succinimidyl Ester)
MB0281	Alexa Fluor 750 NHS Ester (Succinimidyl Ester)
MB0282	Alexa Fluor 546 NHS Ester (Succinimidyl Ester)
MB0286	Alexa Fluor 594 NHS Ester (Succinimidyl Ester)
MB0288	Alexa Fluor 680 NHS Ester (Succinimidyl Ester)
MB0290	Alexa Fluor 790 NHS Ester (Succinimidyl Ester)
MB0293	Alexa Fluor 660 NHS Ester (Succinimidyl Ester)
MB0297	Alexa Fluor 488 NHS Ester (Succinimidyl Ester)
MB0299	Alexa Fluor 532 NHS Ester (Succinimidyl Ester)

- 美仑还为您提供MA0362-快速FITC 抗体(蛋白)标记试剂盒，操作简单，可在约一小时完成蛋白标记和纯化。

产品组成	3T
FITC（异硫氰酸荧光素）	1mg*3
标记缓冲液	5ml
离心型纯化柱	6套
2ml 离心管	6个
纯化凝胶(50%)	12ml

联系我们

- 销售地址：大连市开发区双D港双D二街75号
- 客服热线：400-659-9898
电话：0411-66771944, 0411-66771943, 66771942, 82593920
- 传真：0411-66771945
电子邮件：sales@meilune.com
企业QQ：4006599898
技术咨询及投诉：support@meilune.com
- 官网：www.meilune.com
- 企业公众微信号：meilune-com



品质深耕，价值臻选！

谢谢！