

细胞固定制样指南（适于观测细胞骨架），适合细胞：HeLa, 3T3, 原代成纤维细胞, 成肌细胞, 神经元等：

1. 如果细胞贴壁性较差，需要在厚度为 1.5H 的载玻片上包被 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的聚赖氨酸 1 小时 RT，之后用 PBS 多次清洗，确保聚赖氨酸完全除去；
2. 培养细胞直至贴壁率达到 50-70%，在这个密度下的单个细胞具有较好的成像质量；
3. 除去所有的培养基；
4. 在 37°C 条件下，用 PHEM 缓冲液清洗 3 次；
5. 用 PHEM + 0.5% Triton X-100 进行预渗透 (37°C 下 1min)；
6. 在 PHEM + 4% 多聚甲醛 (PFA) + 0.2% 戊二醛 + 0.5% Triton X-100 中固定 12 分钟；
7. 用 PBS 清洗 7min，重复 3 次；
8. 在 PBS+0.1% Triton X-100 中孵育 10 分钟；
9. 用 PBS 清洗 5min 3 次；
10. 用 NaBH_4 (1 mg/mL 溶解在 PBS 中)，孵育 7-10 分钟；
11. 用 PBS 清洗 5 min，重复 3 次；
12. 用 PBS + 1% BSA 封闭 30 min；
13. 将一抗溶于 PBS+1% BSA 中（请根据一抗说明书选择合适的封闭物质），在 37°C 下染 1 小时或 4°C 下过夜。（抗体具体浓度需要优化，但一般规则是：标记密度要高于常规显微镜或共焦显微镜。）
注：这里一抗根据观测细胞种类选
14. 用 PBS 清洗 5 min，重复 3 次；
15. 将二抗溶于 PBS + 1% BSA 中（二抗的浓度也需要优化，大部分情况下用 AF: Fab/Fab2 比例在 1:300 到 1:400 之间效果比较好），在 37°C 下染约 1 小时或 4°C 下过夜；
注：这里二抗荧光染料请在常用的 STORM 染料列表中选择，系统标配的激光器激光为 405, 488, 561, 640nm 和 750nm，实验时请在表中选取合适的荧光染料。
16. 用 PBS 清洗 10 min，重复 3 次；
17. 用加了 3.7% 甲醛的 PBS 进行固定 10min；
18. 用 PBS 清洗 5 min 3 次；
19. 用加了 50 mM 的 NH_4Cl 封闭醛类 10 min；
20. 用 PBS 清洗 5min，重复 3 次；
21. 用 PBS 保存。

适合单细胞系的 α -微管蛋白的 DM1A 的指南（一抗和二抗选择同上）：

1. 如果细胞贴壁性较差，需要在厚度为 1.5H 的载玻片上包被 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的聚赖氨酸 1 小时 RT，之后用 PBS 多次清洗，确保聚赖氨酸完全除去；
2. 培养细胞直至贴壁率达到 50-70%，在这个密度下的单个细胞具有较好的成像质量；
3. 除去所有的培养基；
4. 在 37°C 条件下，用 PHEM 1.5x (与生长培养基等渗) 缓冲液清洗 3 次；
5. PHEM + 0.3% 戊二醛 + 0.25% Triton X-100 预固定, 37°C 下 2min；
6. 用 PHEM+2% 戊二醛固定，37°C 下 10 分钟；
7. 用 PBS 清洗 5min 3 次；
8. 用 NaBH_4 (PBS 中为 1 mg/mL)，7-10 分钟还原乙醛；
9. 用 PBS 清洗 5min 3 次；
10. 用 PBS + 1% BSA 封闭 30 min；
11. 用溶于 PBS + 2% BSA 中一抗 DM1A 在加湿室中进行染色，浓度比例建议 1:300，37°C



- 下 2 小时;
12. 用 PBS 清洗 10min, 重复 3 次;
 13. 用溶于 PBS + 2% BSA 中二抗在加湿室中进行染色, 浓度比例建议 1:300, 37 °C 下 2 小时;
 14. 用 PBS 清洗 10min, 重复 3 次;
 15. 用加了 3.7% 甲醛的 PBS 进行固定 10min;
 16. 用 PBS 清洗 5min, 重复 3 次;
 17. 用加了 50 mM 的 NH_4Cl 孵育 10 min, 除去醛类;
 18. 用 PBS 清洗 5min, 重复 3 次;
 19. 用 PBS 保存(如果是长时间保存加叠氮酸钠), 或者直接进行采集图像。

若不需要预渗透性, 并且一抗不能耐受高浓度戊二醛, 则可以修改上面第二个的方案为如下:

1. 如果细胞贴壁性较差, 需要在厚度为 1.5H 的载玻片上包被 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的聚赖氨酸 1 小时 RT, 之后用 PBS 多次清洗, 确保聚赖氨酸完全除去;
2. 培养细胞直至贴壁率达到 50-70%, 在这个密度下的单个细胞具有较好的成像质量;
3. 除去所有的培养基;
4. 在 37°C 条件下, 用 PHEM 1.5x (与生长培养基等渗) 缓冲液清洗 3 次;
5. PHEM+0.3% 戊二醛+0.25% Triton X-100 预固定, 37 °C 下 2min;
6. 用 PHEM+2% 戊二醛固定, 37 °C 下 10 分钟;
7. 用 PBS 清洗 5min, 重复 3 次;
8. 乙醛还原步骤, 用 NaBH_4 (PBS 中为 1 mg/mL), 7-10 分钟;
9. 用 PBS 清洗 5 min, 重复 3 次;
10. 用 PBS + 1% BSA, 封闭 30 min;
11. 用溶于 PBS+2% BSA 中一抗 DM1A 在加湿室中进行染色, 浓度比例建议 1:300, 37 °C 下 2 小时;
12. 用 PBS 清洗 10min 3 次;
13. 用溶于 PBS +2% BSA 中二抗在加湿室中进行染色, 浓度比例建议 1:300, 37 °C 下 2 小时;
14. 用 PBS 清洗 10min 3 次;
15. 用加了 3.7 % 甲醛的 PBS 进行固定 10 min;
16. 用 PBS 清洗 5 min 3 次;
17. 用加了 50 mM 的 NH_4Cl 孵育 10 min 除去醛类;
18. 用 PBS 清洗 5min 3 次;
19. 用 PBS 保存(如果是长时间保存加叠氮酸钠), 或者直接进行采集图像。

北京办公室

北京市朝阳区酒仙桥路 10 号恒通商务园 B22 座 501 室 100015
电话: 010-8512 0277/78/79/80
传真: 010-8512 0276
邮箱: info@qd-china.com
节假日紧急垂询电话: 13021034795

上海办公室

上海市静安区威海路 511 号
上海国际集团大厦 1405 室 200041
电话: 021-5228 0980
传真: 021-5228 2156
邮箱: info@qd-china.com
节假日紧急垂询电话: 13021034795

广州办公室

广州市番禺区汉溪大道东 290 号
保利大都汇 A3 栋 1509 室 511495
电话: 020-8920 2739
传真: 020-8920 2750
邮箱: info@qd-china.com
节假日紧急垂询电话: 13021034795

