

细胞免疫荧光实验报告

一、实验材料

1. 细胞株

大鼠软骨细胞、髓核细胞

2. 主要试剂

DMEM 培养基（武汉普诺赛，PM150210/500 ml）

OPTI-MEM 培养基（美国 Gibco，31985062）

FBS（美国 Gibco，12664025）

青霉素-链霉素溶液（双抗，武汉普诺赛，PB180120）

0.25%胰酶（美国 Hyclone，SH30042.01/100 ml）

PBS（南京生兴生物，SN331）

多聚甲醛（上海阿拉丁，30525-89-4）

BSA（北京索莱宝，A8020）

DAPI 染色液（上海 Biosharp，BL105A）

3. 主要仪器设备

高压灭菌锅（西安仪创公司，BXM-30R）

超净工作台（苏净集团安泰公司，SW-CJ-1F）

CO₂ 培养箱（美国 ThermoFisher，3131）

离心机（美国 Eppendorf，5417R）

倒置相差显微镜（日本 Olympus，CKX31 型）

倒置荧光显微镜（上海蔡康光学仪器有限公司，XDS-100）

二、实验方法

1. 细胞接种

(1) 待细胞汇合度为 70~90%时，弃掉培养瓶中的原培养基，加入无菌的 PBS 冲洗 2 次，加入 1 ml 的 0.25%胰酶，37℃ 孵育 1~2 min。

(2) 显微镜观察到大量细胞脱离呈漂浮状态时，立即加入两倍胰酶量的含血清的培养基，终止胰酶消化，倾斜培养皿或培养瓶，自上而下吹打，使未脱落的细胞脱离。

(3) 将培养瓶的液体转移到灭菌的 15 ml 的离心管中，1000 rpm 离心 5 min。

(4) 将离心管上清液去掉，加入新鲜的培养基吹打均匀，使重悬于培养基中。

(5) 用血细胞计数板进行细胞计数：取少量细胞悬液，将细胞悬液滴入盖有盖玻片的血细胞计数板中间平台两侧的沟槽中，使细胞悬液充满盖玻片与计数板间（不要有气泡），静置 2~3 min，通过显微镜计算四个大方格（由 4×4 的小方格组成）中的细胞，计算细胞总量。公式为：细胞数/ml=四大格细胞总数/4×10⁴。

2. 细胞固定

(1) 将细胞培养板中的培养基去掉，用预冷的 PBS 洗涤 2 次。

(2) 加入 4%多聚甲醛，室温下固定 10 min。

(3) 用 PBS 洗涤 2 次，每次 5 min。

(4) 加入含 0.1% Triton X-100 的 PBS 中，室温下透化 10 min。

(5) 用 PBS 洗涤 2 次，每次 5 min。

3. 荧光染色

(1) 加入用 PBS 配制成 5% BSA 封闭液，室温封闭 30 min。

(2) 吸去液体，直接添加用 1% BSA 稀释的一抗（稀释比例 1:100），于室温下孵育 1 h。

(3) 用 PBS 洗涤 3 次，每次 5 min。

(4) 加入 1% BSA 稀释的荧光素标记的二抗（稀释比例 1:500），室温下避光孵育 1 h。

(5) 用 PBS 洗涤 3 次，每次 5 min。

(6) 去除 PBS，加入 DAPI 染液，室温下染色 5 min。

(7) 用 PBS 洗涤 3 次，每次 5 min。

(8) 倒置荧光显微镜下观察拍照。

三、实验结果

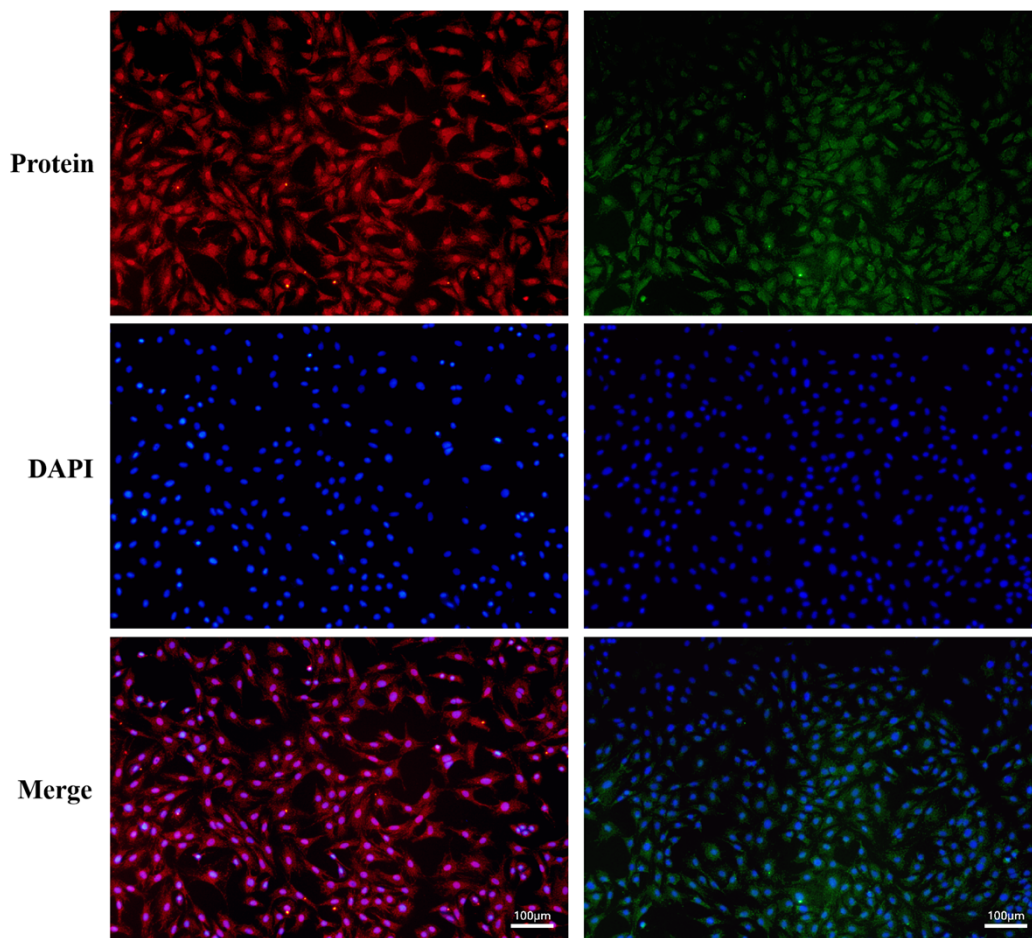


图1 大鼠软骨细胞、髓核细胞免疫荧光结果 (100×, n=3)