

细胞分析

细胞成像分析实验方案

引言

本手册汇集了成像实验的经典案例和详尽实验方案，其中包括了详实的实验技巧、小贴士、试剂耗材目录以及图像采集的显微镜类型。

Invitrogen™ 是高质量细胞成像和分析解决方案的全球领先品牌。可提供包括细胞结构、功能探针、标记试剂和复染剂等全品类应用试剂，还包含获得高质量细胞图像的其他产品，如靶点丰富、品质卓越的一抗和荧光二抗，以及多种配置且性能优越的细胞成像设备。

有了明确的实验方案和精良的实验工具，您可轻松采集可靠又漂亮的细胞成像数据。

了解更多信息，请访问 thermofisher.cn/cellimaging

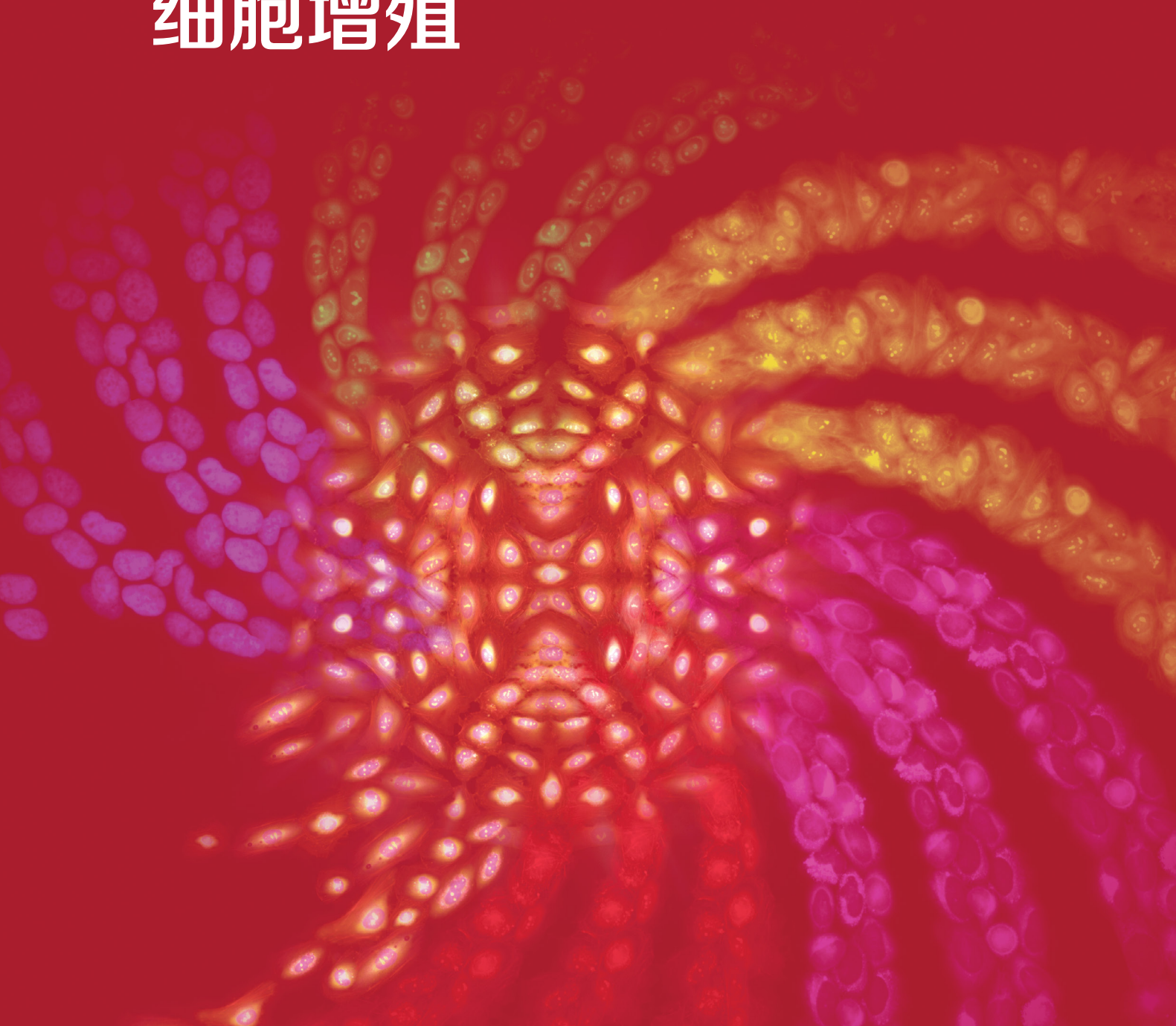


目录

细胞增殖	
Click-iT EdU 成像试剂盒	1
Click-iT Plus EdU 成像试剂盒	5
Click-iT EdU 比色 IHC 检测试剂盒	9
<hr/>	
细胞活力	
LIVE/DEAD 细胞活力/毒性试剂盒	15
ReadyProbes 细胞活力成像试剂盒 (蓝/红)	16
<hr/>	
细胞结构	
MitoTracker 线粒体选择性探针	17
标记肌动蛋白的鬼笔环肽试剂	20
CellLight BacMam 2.0 试剂	25
Tubulin Tracker 试剂	27
LysoTracker 和 LysoSensor 探针	29
ER-Tracker 染料: 用于活细胞内质网标记	31
SelectFX 细胞核标记试剂盒	34
Hoechst 染料	36
SYTO 9 染料	38
SYTO 59 染料	39
<hr/>	
活细胞成像	
线粒体膜电位探针	41
CellEvent Caspase-3/7 Green 检测试剂	43
CellROX 氧化应激试剂	46
CellTracker 荧光探针	47
<hr/>	
免疫标记	
甲醛固定和破膜细胞的ICC染色	51
ICC 生物素/链霉亲和素信号放大	55
石蜡组织切片间接 IHC	57
组织冰冻切片间接IHC	59
固定组织 IHC 生物素/链霉亲和素信号放大	61
ICC 和 IHC 酪胺信号放大	63
<hr/>	
细胞全景绘制	
细胞全景绘制	69

细胞分析

细胞增殖



Click-iT EdU 成像试剂盒

基于 DNA 合成的细胞增殖检测

简介

在本实验中，经过修饰的胸苷类似物 EdU（5-乙炔基-2'-脱氧尿苷）有效结合到新合成的 DNA 中，并用快速、高度特异性、温和的点击化学反应完成明亮、光稳定的 Invitrogen™ Alexa Fluor™ 荧光染料标记。

试剂与耗材

- Invitrogen™ Click-iT™ EdU 成像试剂盒（货号 C10338、C10340、C10337、C10339）。各试剂的详细信息，请参阅用户手册。
- PBS（货号 10010-023）
- 固定剂，如 Invitrogen Image-iT 固定 / 破膜试剂盒（货号 R37602）或用 PBS 配制的 4% 甲醛（货号 R37814）
- 破膜剂，如 Invitrogen™ Image-iT™ 固定 / 破膜试剂盒（货号 R37602）或 Thermo Scientific™ Triton™ X-100
- 用 PBS 配制的 3% 牛血清白蛋白（BSA）（pH = 7.4）
- 去离子水（货号 751-610）
- 18 × 18 mm 盖玻片
- 可选：6 孔微孔板

方案

制备母液

1. 确保各个试剂均为室温。
2. 向试剂盒组分 A 中加入 2 mL DMSO（组分 C）或水溶液，制成 10 mM EdU 母液。在 -20°C 下储存。
3. 向组分 D 中加入 36 mL 去离子水，制成 1X Click-iT EdU 反应缓冲液。在 2~8°C 下储存。
4. 向组分 B 中加入 70 μL DMSO（组分 C），混合均匀，制成 Alexa Fluor™ 叠氮化物。在 -20°C 下储存。

重要说明

本方案可用于：

- 使用 Invitrogen™ EVOS™ 成像系统检测 DNA 合成

本方案不可应用于：

- 流式细胞术；如需了解流式细胞术方案，请参阅 Click-iT EdU 流式细胞术方案

小贴士

- 如用于体内实验，可以购买专用的 EdU（货号 A10044、E10187）。
- 固定/破膜剂（如甲醇和皂苷）可以代替其中的 Triton X-100 去垢剂。

Click-iT EdU 成像试剂盒 (续)

基于 DNA 合成的细胞增殖检测

5. 向组分 F 中加入 2 mL 去离子水, 混合均匀, 制成 10X Click-iT EdU 缓冲液添加剂。在 -20°C 下储存。
6. 在 PBS 中稀释 (稀释比例为 1:2,000) Invitrogen™ Hoechst™ 33342 染料 (组分 G), 制成 1X 溶液。

使用 EdU 标记细胞

1. 将细胞铺在盖玻片上, 孵育过夜。
2. 在 5 mL 预热组织培养基中稀释 10 μ L 10 mM EdU 母液, 制成 20 μ M EdU 标记溶液 (足够铺 10 个盖玻片)。
3. 除去细胞中的一半培养基。
4. 替换为等体积的 EdU 标记溶液 (终浓度为 10 μ M)。
5. 在适当的生长条件和处理方式下, 孵育细胞 2 h。生长缓慢的细胞可能需要更长的孵育时间。
6. 立即进行固定和破膜。

固定和破膜

1. 在 6 孔板的每个孔中分别加入 1 片盖玻片。
2. 向每个孔中加入 1 mL 用 PBS 配制的 4% 甲醛。
3. 在室温下孵育 15 min。
4. 除去甲醛, 并使用 1 mL 3% BSA (用 PBS 配置) 洗涤 2 次。
5. 除去清洗液, 并向每个孔中加入 1 mL 用 PBS 配制的 0.5% Triton X-100。
6. 在室温下孵育 20 min。

本方案在第 3 页继续

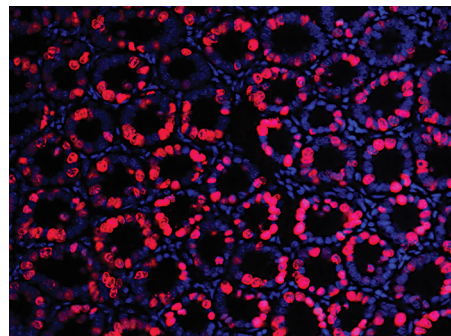


图 1. 使用 Click-iT EdU 简化整个检测流程。使用红色荧光 Click-iT EdU Alexa Fluor 594 成像试剂盒检测大鼠回肠组织切片。EdU 染色在 80 min 内完成, 而 BrdU 方案需要强力破膜和过夜抗 BrdU 检测。使用蓝色荧光 Hoechst 33342 染料 (货号 H1399) 复染细胞核。

检测 EdU

1. 在去离子水中稀释 (稀释比例为 1:10) 10X Click-iT EdU 缓冲液添加剂, 制成 1X Click-iT EdU 缓冲液添加剂。溶液制成后, 应在 8 h 内使用。

2. 根据下表制备 Click-iT 反应混合物。按照表中所列顺序添加试剂。

反应试剂*	盖玻片数量						
	1	2	4	5	10	25	50
1X Click-iT EdU 反应缓冲液	430 μ L	860 μ L	1.8 mL	2.2 mL	4.3 mL	10.7 mL	21.4 mL
CuSO ₄ (组分 E)	20 μ L	40 μ L	80 μ L	100 μ L	200 μ L	500 μ L	1 mL
Alexa Fluor 叠氮化物	1.2 μ L	2.5 μ L	5 μ L	6 μ L	12.5 μ L	31 μ L	62 μ L
1X Click-iT EdU 缓冲液添加剂	50 μ L	100 μ L	200 μ L	250 μ L	500 μ L	1.25 mL	2.5 mL
总体积	500 μ L	1 mL	2 mL	2.5 mL	5 mL	12.5 mL	25 mL

* 注意: 按照表中所列顺序添加反应试剂。

3. 除去细胞中的破膜缓冲液, 并使用 1 mL 3% BSA (用PBS配置) 洗涤 2 次。

4. 除去清洗液。

5. 向每个孔中加入 0.5 mL Click-iT EdU 反应混合物。轻轻摇晃微孔板, 确保反应混合物均匀分布。

6. 在室温下避光孵育微孔板 30 min。

7. 除去反应混合物, 并使用 1 mL 3% BSA (用PBS配置) 洗涤每个孔 1 次。

多重标记: 抗体标记、核复染

1. 用 1 mL PBS 洗涤每个孔。除去清洗液。

2. 每孔加入 1 mL 1X Hoechst 33342 染色液。

3. 在室温下避光孵育 30 min。

可选

按照厂商的建议对样品进行抗体标记。我们提供丰富的高质量抗体组合, 请访问 thermofisher.cn/antibodies 了解详情。

本方案在第 4 页继续

Click-iT EdU 成像试剂盒 (续)

基于 DNA 合成的细胞增殖检测

4. 除去 Hoechst 33342 溶液。

5. 用 1 mL PBS 洗涤每个孔 2 次。

6. 除去清洗液。

成像

1. 用 Click-iT EdU 标记的细胞与所有玻片制备方法兼容, 包括水浸片和制备好的封片剂。

2. 在细胞成像过程中, 使用下列适当的滤光片:

Invitrogen™ 染料	Hoechst™ 33342	Alexa Fluor™ 488	Alexa Fluor™ 555	Alexa Fluor™ 594	Alexa Fluor™ 647
激发波长/发射波长 (nm)	350/461	495/519	555/615	590/615	650/670
标准滤光片	DAPI	FITC	RFP	Texas Red	Cy®5

Click-iT Plus EdU 成像试剂盒

基于 DNA 合成的细胞增殖检测

简介

在本实验中，经过修饰的胸苷类似物 EdU（5-乙炔基-2'-脱氧尿苷）有效结合到新合成的 DNA 中，并在快速、高度特异性、温和的点击化学反应中使用明亮、光稳定的 Alexa Fluor 染料完成荧光标记。

由于反应条件温和，Invitrogen™ Click-iT™ Plus EdU 检测可以精确测定细胞增殖，同时保留细胞形态、DNA 完整性、抗原结合位点和 GFP 的荧光信号。

试剂与耗材

- Click-iT Plus EdU 成像试剂盒（货号 C10637、C10638、C10639、C10640）。各试剂的详细信息，请参阅用户手册。
- PBS（货号 10010-023）
- 固定剂，如 Invitrogen™ Image-iT™ 固定/破膜试剂盒（货号 R37602），用 PBS 配制的 4% 甲醛（货号 R37814）
- 破膜剂，如 Invitrogen™ Image-iT™ 固定/破膜试剂盒（货号 R37602），Thermo Scientific™ Triton™ X-100 去垢剂
- 用 PBS 配制的 3% 牛血清白蛋白（BSA）（pH = 7.4）
- 去离子水（货号 751-610）
- 18 × 18 mm 盖玻片
- 可选：6 孔微孔板

方案

制备母液

1. 确保各个试剂均为室温。
2. 向组分 A 中加入 2 mL DMSO（组分 C）或水溶液，制成 10 mM EdU 母液。在 -20°C 下储存。
3. 向 36 mL 去离子水中加入 4 mL 组分 D，制成 1X Click-iT EdU 反应缓冲液。在 2~8°C 下储存所有剩余溶液。

重要说明

本方案可用于：

- 使用 Invitrogen™ EVOS™ 成像系统检测 DNA 合成

本方案不应用于：

- 流式细胞术；如需了解流式细胞术方案，请参阅 Click-iT EdU 流式细胞术方案

小贴士

- 如用于体内实验，可以购买专用的 EdU（货号 A10044、E10187）
- 固定/破膜剂（如甲醇和皂苷）可以代替其中的 Triton X-100 去垢剂。

Click-iT Plus EdU成像试剂盒(续)

基于 DNA 合成的细胞增殖检测

4. 向组分 F 中加入 2 mL 去离子水, 混匀至完全溶解, 制成 10X Click-iT EdU 缓冲液添加剂。在 -20°C 下储存。
5. 在 PBS 中稀释 (稀释比例为 1:2,000) Hoechst 33342 染料 (组分 G), 制成 1X 溶液。

使用 EdU 标记细胞

1. 将细胞铺在盖玻片上, 孵育过夜。
2. 在 5 mL 预热组织培养基中稀释 10 μ L 10 mM EdU 母液, 制成 20 μ M EdU 标记溶液 (足够铺 10 个盖玻片)。
3. 除去细胞中的一半培养基。
4. 替换为等体积的 EdU 标记溶液 (终浓度为 10 μ M)。
5. 在适当的生长条件下, 孵育细胞 2 h。
6. 立即进行固定和破膜。

说明

孵育时间可能要根据细胞生长速率调整。

固定和破膜细胞

1. 将每个盖玻片分别转移到 6 孔板的一个孔中。
2. 向每个孔中加入 1 mL 用 PBS 配制的 3.7% 甲醛。
3. 在室温下孵育 15 min。
4. 除去甲醛, 并使用 1 mL 用 PBS 配制的 3% BSA 洗涤 2 次。
5. 除去清洗液, 并向每个孔中加入 1 mL 用 PBS 配制的 0.5% Triton X-100。
6. 在室温下孵育 20 min。

本方案在第 7 页继续

检测 EdU

1. 在去离子水中稀释 (稀释比例为 1:10) 10X Click-iT EdU 缓冲液添加剂, 制成 1X Click-iT EdU 缓冲液添加剂。当天制备的溶液需要在当天使用。
2. 根据下表制备 Click-iT Plus 反应混合物。

反应试剂*	盖玻片数量						
	1	2	4	5	10	25	50
1X Click-iT 反应缓冲液	440 µL	880 µL	1.84 mL	2.25 mL	4.4 mL	10.9 mL	21.9 mL
铜保护剂	10 µL	20 µL	40 µL	50 µL	100 µL	250 µL	500 µL
Alexa Fluor 甲基吡啶叠氮化物 (组分 B)	1.2 µL	2.5 µL	5 µL	6 µL	12.5 µL	31 µL	62 µL
1X Click-iT EdU 缓冲液添加剂	50 µL	100 µL	200 µL	250 µL	500 µL	1.25 mL	2.5 mL
总体积	500 µL	1 mL	2 mL	2.5 mL	5 mL	12.5 mL	25 mL

* 注意: 按照表中所列顺序添加反应试剂。

3. 除去细胞中的破膜缓冲液, 并使用 1 mL 3% BSA (用PBS配置) 洗涤 2 次。
4. 除去清洗液。
5. 向每个孔中加入 0.5 mL Click-iT Plus 反应混合物。轻轻摇晃微孔板, 确保反应混合物均匀分布。
6. 在室温下避光孵育微孔板 30 min。
7. 除去反应混合物, 并使用 1 mL 3% BSA (用PBS配置) 洗涤每个孔 1 次。

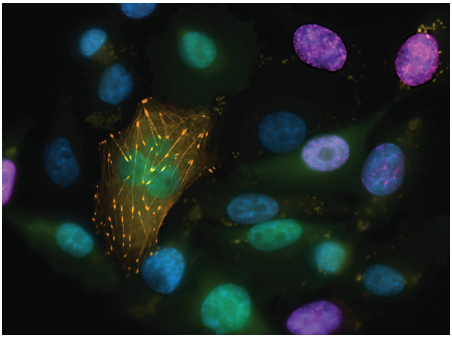


图 2.使用与 GFP 兼容的 Click-iT Plus EdU Alexa Fluor 647 完成多色成像。

Click-iT Plus EdU

成像试剂盒 (续)

基于 DNA 合成的细胞增殖检测

染色 DNA

1. 用 1 mL PBS 洗涤每个孔。除去清洗液。
2. 每孔加入 1 mL 1X Hoechst 33342 染色液。
3. 在室温下避光孵育 30 min。
4. 除去 Hoechst 33342 溶液。
5. 用 1 mL PBS 洗涤每个孔 2 次。
6. 除去清洗液。

可选

此时, 按照一抗和二抗厂商的建议对样品进行抗体标记。

说明

在这些孵育过程中, 要避光保护样品。

成像

1. 用 Click-iT Plus EdU 标记的细胞兼容所有玻片制备方法, 包括水浸片和制备好的封片剂。
2. 在细胞成像过程中, 使用下列适当的滤光片。

Invitrogen™ 染料	Hoechst™ 33342	Alexa Fluor™ 488	Alexa Fluor™ 555	Alexa Fluor™ 594	Alexa Fluor™ 647
激发波长/发射波长 (nm)	350/461	495/519	555/615	590/615	650/670
标准滤光片	DAPI	FITC	RFP	Texas Red	Cy®5

Click-iT EdU 比色 IHC 检测试剂盒

简介

Invitrogen™ Click-iT™ EdU 比色 IHC 检测试剂盒是一种替代 BrdU 检测的新型检测。EdU (5-乙炔基-2'-脱氧尿苷) 是胸苷的核苷类似物, 在活性 DNA 合成过程中被结合到 DNA 中。在靶组织固定并包埋在石蜡中后, “点击反应” 将生物素-叠氮化物共价连接到 EdU (已掺入) 的炔基团上。然后, 将链霉亲和素-过氧化物酶 (辣根过氧化物酶) 添加到样品中, 连接到生物素基团上。最后, 添加 DAB (过氧化物酶) 底物, 对增殖细胞进行比色检测。

试剂与耗材

- Click-iT EdU 比色 IHC 检测试剂盒 (货号 C10644)
- 1X 磷酸盐缓冲液 (PBS), 如 Gibco™ DPBS (货号 14190-144 或 14190-250)
- 用 PBS 配制的 3% H₂O₂
- 18 × 18 mm 盖玻片 (适用于标准显微镜)
- 可选: Invitrogen™ EdU (货号 A10044、E10187、E10415)

说明

本试剂盒可以标记 50 个组织切片样品, 每个样品反应体积 500 μL。如果需要, 可以单独购买 EdU。

方案

制备母液

1. EdU 易溶于 DMSO、乙醇、水或水性缓冲液。根据所需应用, 在 DMSO 或水性缓冲液中制备适量的 EdU 母液。要制备 10 mM EdU (组分 A) 溶液, 可向组分 A 中加入 4 mL DMSO 或水溶液 (如缓冲液, 盐水), 然后混合均匀。10 mM EdU 母液可以在 ≤ -20°C 下储存长达 1 年。

已知 EdU 的特征吸收峰 (288 nm) 和吸光度, 再根据消光系数 (在甲醇中为 12,000 M⁻¹), 可以精确定量母液。10 mg/mL 溶液 (39.6 mM) 在甲醇中稀释 (稀释比例为 1:1,000) 时, 在 288 nm 处的吸光度为 0.475。

重要说明

开盖前请先将试剂平衡至室温。

2. 1X Click-iT EdU 反应缓冲液 (组分 B) 工作溶液: 向 36 mL 去离子水中加入 4 mL 组分 B。用少量稀释的 Click-iT EdU 反应缓冲液润洗组分 B 试剂瓶, 确保转移所有 10X 浓缩液。要制备少量 1X Click-iT EdU 反应缓冲液, 可在去离子水中稀释 (比例稀释为 1:10) 从组分 B 瓶中取出的适量溶液。使用后, 在 2~8°C 下储存所有剩余的 1X 溶液。如果按照指示储存, 1X 溶液可稳定保存长达 6 个月。

本方案在第 9 页继续

Click-iT EdU 比色 IHC 检测试剂盒 (续)

3. 10X Click-iT EdU 反应缓冲液添加剂 (组分 F) 母液: 向组分 F 试剂瓶中加入 2 mL 去离子水, 混合至完全溶解。使用后, 在 $\leq -20^{\circ}\text{C}$ 下储存所有剩余的母液。如果按照指示储存, 母液可稳定保存长达 1 年。如果溶液变成棕色, 则说明溶液已分解, 应丢弃。
4. 生物素-叠氮化物 (组分 D) 母液: 向组分 D 试剂管中加入 70 μL DMSO (组分 E), 混合均匀。使用后, 在 $\leq -20^{\circ}\text{C}$ 下储存所有剩余的母液。如果按照指示储存, 母液可稳定保存长达 1 年。
5. 1X Click-iT EdU 清洗缓冲液: 在 1X PBS 中稀释 (稀释比例为 1:20) Click-iT EdU 清洗缓冲液 (组分 H)。

说明

如果需要处理的载玻片为 4 个或更少, 则可以使用清洗盒 (试剂盒中提供; 可以装 24 mL 清洗缓冲液)。

以下方案描述了对 FFPE 组织样品进行 Click-iT EdU 比色 IHC 检测分析的方法。

EdU 标记

根据小鼠体型和处理方法 (腹腔注射或饮用水), 10 mg EdU (组分 A) 足以标记 1~2 只小鼠。

在初始实验中, 我们建议测试一系列 EdU 浓度, 从而确定最佳浓度。最佳浓度可能因标记处理时间而异。对于较长的孵育时间, 建议使用较低的浓度。以下是关于 EdU 标记的一般建议。

物种	参考文献*
线虫 (秀丽隐杆线虫)	Dorsett M, Westlund B, Schedl T (2009) <i>Genetics</i> 183: 233–247.
扁虫 (海洋)	<i>BioProbes</i> 61
蟋蟀	Bando T, Mito T, Maeda Y et al. (2009) <i>Development</i> 136: 2235–2245.
小鼠	Salic A (2008) <i>Proc Natl Acad Sci USA</i> 105: 2415–2420. Bonaguidi MA, Peng CY, McGuire T et al. (2008) <i>J Neurosci</i> 28: 9194–9204. Kharas MG, Janes MR, Scarfone VM et al. (2008) <i>J Clin Invest</i> 118: 3038–3050. Zeng C et al. (2010) <i>Brain Res</i> 1319: 21–32.
大鼠	Scientific poster, ASCB 2007
斑马鱼幼鱼	<i>BioProbes</i> 57
斑胸草雀	Scientific poster, ASCB 2007
人源干细胞	McCord AM, Jamal M, Williams ES et al. (2009) <i>Clin Cancer Res</i> 15: 5145–5153. Momcilovic O, Choi S, Varum S et al. (2009) <i>Stem Cells</i> 27: 1822–1835.

* 请访问 thermofisher.cn/edu, 获取 PubMed 文献列表、学术海报或详细方案的链接。

组织切片脱蜡

1. 要除去组织切片上的石蜡, 可将载玻片放在架子上, 然后科普林染色缸中执行下表所列的清洗步骤, 或使用标准的脱蜡水化方案。

组织脱蜡流程	
溶液	孵育时间
二甲苯	5 min
二甲苯	5 min
100% 乙醇	5 min
100% 乙醇	5 min
95% 乙醇	5 min
85% 乙醇	5 min
75% 乙醇	5 min
50% 乙醇	5 min
1X PBS	5 min

2. 要淬灭内源性过氧化物酶, 可在室温下将载玻片浸入用 PBS 配制的 3% H_2O_2 溶液中 10 min。
3. 用 1X PBS 冲洗 3 次, 每次 2 min。
4. 使用胰蛋白酶-EDTA (组分 G) 来消化组织切片, 帮助抗原修复。最佳消化时间取决于组织类型。大多数其他抗原修复方法已经过测试, 可以用来代替胰蛋白酶消化。无需 DNA 暴露步骤。常见处理方法请见下表。

各种组织的胰蛋白酶-EDTA 处理建议			
物种	组织类型	孵育时间	温度
小鼠 (胚胎)	心脏	0~5 min	室温
小鼠 (成年)	心脏	20~30 min	室温
大鼠	乳腺	10 min	室温
大鼠	肠	20~30 min	室温
大鼠	子宫	30 min	37°C
斑马鱼 (成年)	尾鳍	0~5 min	室温

说明

在孵育步骤中, 用盖玻片覆盖组织, 从而使组织被均匀覆盖。擦干载玻片边缘, 然后再添加胰蛋白酶-EDTA, 可以防止毛细作用。

本方案在第 12 页继续

Click-iT EdU 比色 IHC 检测试剂盒 (续)

5. 用 1X PBS 洗涤组织切片 3 次, 每次 2 min, 从而除去胰蛋白酶-EDTA 溶液。如果使用盖玻片, 在继续清洗步骤之前, 倾斜载玻片, 取下盖玻片。

EdU 检测

1. 在去离子水中稀释 (稀释比例为 1:10) 10X 溶液, 制成 1X Click-iT EdU 反应缓冲液添加剂的工作溶液。当天制备的溶液在当天使用。丢弃任何未使用的 1X 溶液。
2. 根据下表制备 Click-iT EdU 反应混合物。务必按照表中顺序添加反应试剂; 否则, 反应无法顺利进行。

反应试剂*	盖玻片数量				
	1	2	4	5	10
1X Click-iT 反应缓冲液 (来自“制备母液”的步骤 2)	439 µL	878 µL	1.8 mL	2.2 mL	4.4 mL
CuSO ₄ (组分 C)	10 µL	20 µL	40 µL	50 µL	100 µL
生物素-叠氮化物 (来自“制备母液”的步骤 4)	1.2 µL	2.5 µL	5 µL	6 µL	12.5 µL
1X Click-iT™ EdU 反应缓冲液添加剂 (来自“EdU 检测”的步骤 1)	50 µL	100 µL	200 µL	250 µL	500 µL
总体积 (近似)	500 µL	1 mL	2 mL	2.5 mL	5 mL

* 注意: 按照表中所列顺序添加反应试剂。

3. 制备完成后, 立即向预备的组织切片中加入 0.5 mL Click-iT EdU 反应混合物 (来自步骤 2), 要让溶液完全覆盖组织表面。
4. 在室温下孵育 30 min。
5. 可选: 使用 1X Click-iT EdU 清洗缓冲液 (来自“制备母液”的步骤 5) 洗涤组织切片 15 min。此可选步骤可降低背景信号。

说明

在本方案中, 每个组织切片使用 500 µL Click-iT EdU 反应混合物。只要所有其他试剂体积都保持相同的比例, 就可以使用较低的试剂体积。

重要说明

Click-iT EdU 反应混合物应在制备后 15 min 内使用。

说明

我们建议使用盖玻片或湿箱来防止蒸发。

说明

对于步骤 5, 我们建议使用试剂盒中提供的清洗盒。

6. 在室温下, 用 1X PBS 洗涤组织切片 3 次, 每次 2 min。
7. 添加 2 滴 1X 链霉亲和素-过氧化物酶偶联物 (组分 I), 然后在湿箱中室温孵育 30 min。
8. 在室温下, 用 1X PBS 洗涤组织切片 3 次, 每次 2 min, 从而除去游离的链霉亲和素-过氧化物酶偶联物。如果使用盖玻片, 在继续清洗步骤之前, 倾斜载玻片, 取下盖玻片。
9. 在去离子水中短暂冲洗, 除去残留水分, 但注意不要让组织变干。
10. 对应每张待成像的载玻片, 在离心管中混合 10 μ L DAB 显色剂 (组分 K) 和 190 μ L DAB 底物缓冲液 (组分 J), 制成 200 μ L 1X DAB 反应混合物, 然后立即使用。因此, 在 DAB 底物缓冲液中, DAB 显色剂的稀释比例为 1:20。
11. 向每个组织切片中加入 200 μ L 1X DAB 反应混合物 (DAB 显色剂的稀释比例为 1:20; 来自步骤 10), 并根据所需信号强度在室温下孵育 1~10 min。丢弃任何未使用的 1X 溶液。
12. 如果需要, 用去离子水和复染剂彻底洗涤每个组织切片。在成像前, 将组织切片封在标准水性封片剂或硬质封片剂中。如果需要, 还可以在封片之前对组织切片进行成像。

说明

在孵育步骤中, 用盖玻片覆盖组织, 从而使组织被反应试剂均匀覆盖。擦干载玻片边缘, 然后再添加链霉亲和素-过氧化物酶偶联物, 可以防止毛细作用。

重要说明

制备 1X DAB 反应混合物后应立即使用。丢弃任何未使用的 1X 溶液。

说明

根据所需信号强度, 可能需要优化推荐的 DAB 显色剂稀释比例 (1:20)。如果信号出现太快, 可能需要将 DAB 显色剂的稀释比例调整为 1:100~1:200。

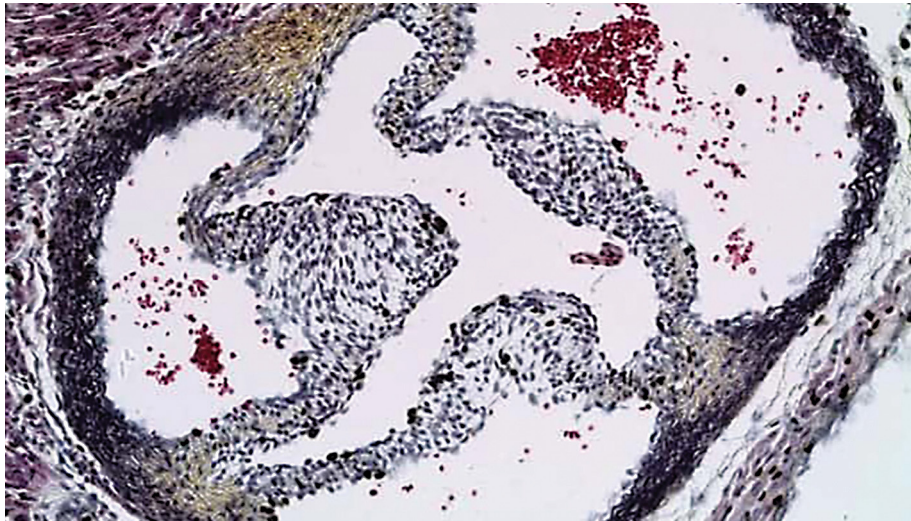
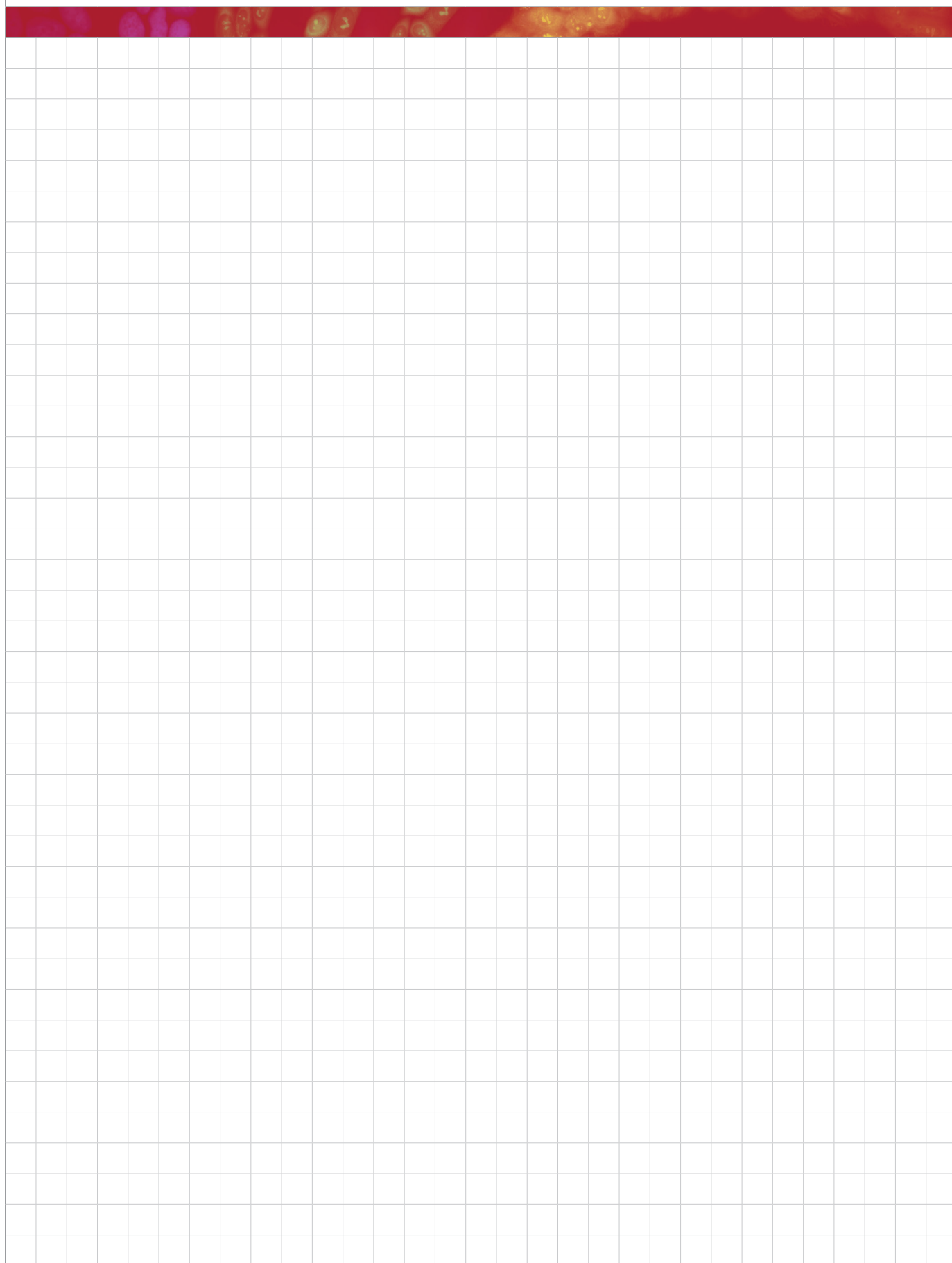
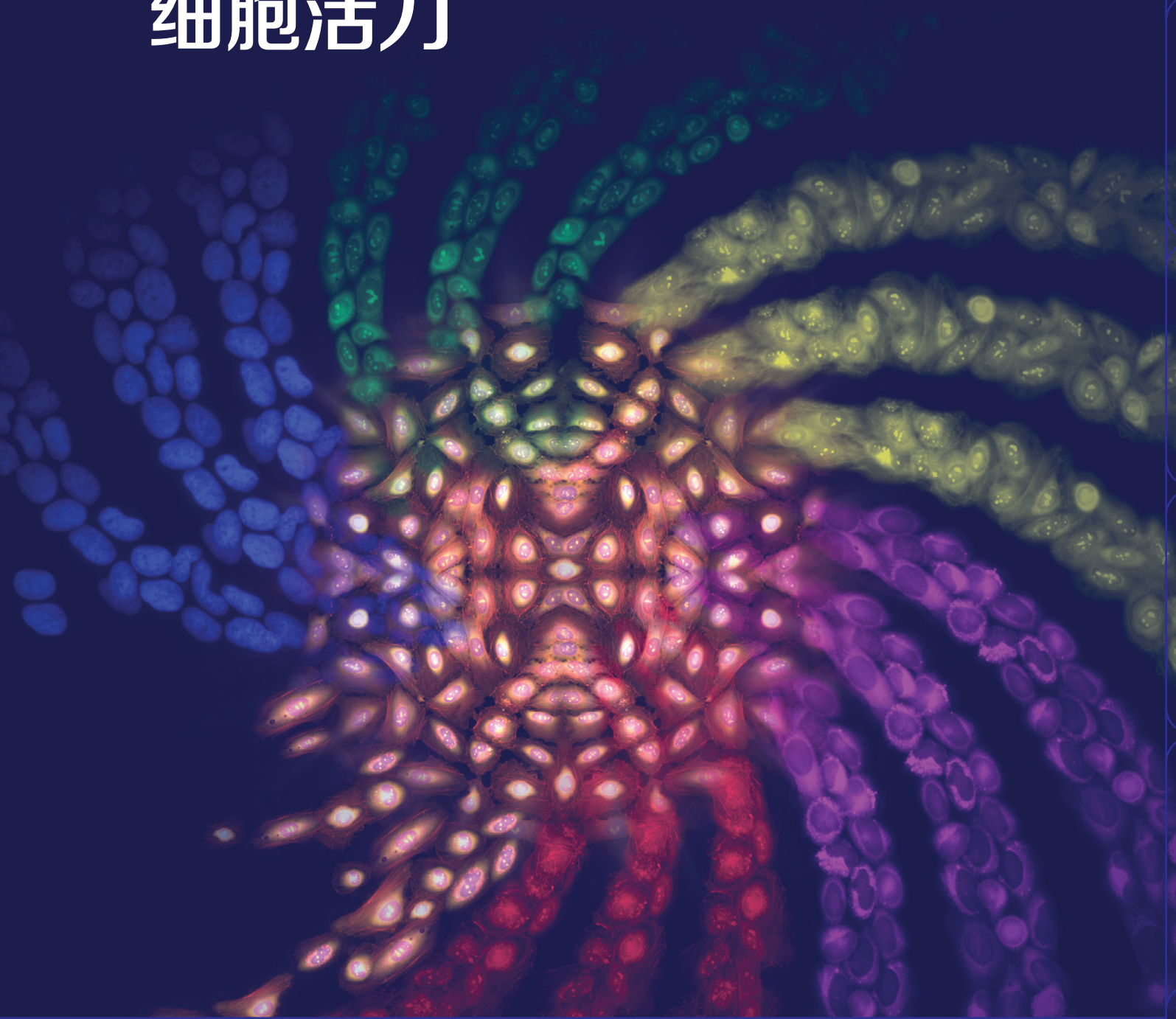


图 3. 使用 Click-iT EdU 比色试剂盒和 Movat 五色套染液标记小鼠心脏组织中的增殖细胞。



细胞分析

细胞活力



LIVE/DEAD 细胞活力/毒性试剂盒

双色双参数哺乳动物细胞活力检测

简介

该试剂盒支持使用两种常见的显微镜滤光片（FITC 和 RFP）来快速轻松地测定细胞活力，支持同时使用绿色荧光钙黄绿素 AM（指示细胞内酯酶活性）和红色荧光 EthD-1（指示质膜完整性的丧失）来进行细胞染色，从而区分活细胞和死细胞。

试剂与耗材

- 在培养基中生长的细胞
- Invitrogen™ LIVE/DEAD™ 细胞活力/细胞毒性试剂盒（货号 L3224）。各试剂的详细信息，请参阅用户手册。
- Gibco™ 杜氏磷酸盐缓冲液（DPBS）（货号 14040-117）
- Invitrogen™ EVOS™ 成像系统（配备 FITC 和 RFP 滤光片）

方案

- 在适当的培养基和容器中培养用于镜检的细胞。
- 开盖前请先将试剂平衡至室温。
- 向 10 mL DPBS 中加入 5 μL 钙黄绿素 AM（组分 A）和 20 μL EthD-1（组分 B），制成染色液。
- 除去细胞中的培养基。
- 直接向细胞中加入 100~200 μL 染色液。
- 在 20~25°C 下孵育 30 min。
- 细胞成像。

光谱信息和储存条件		
Invitrogen™ 染料	钙黄绿素 AM	EthD-1
激发波长/发射波长	494/517 nm	528/617 nm
标准滤光片	FITC 或 GFP	RFP
EVOS 光立方	GFP	RFP
储存条件	-20°C	-20°C

重要说明

本方案可用于：

- 使用 Invitrogen™ EVOS™ 成像系统鉴别活细胞和死细胞

本方案不可应用于：

- 流式细胞术

小贴士

- 在 1 天内用完母液。
- 最佳染料浓度可能因细胞类型而异；在确保背景较低的前提下，建议使用尽量高浓度的染料。
- 该染色方案不耐受固定/破膜。

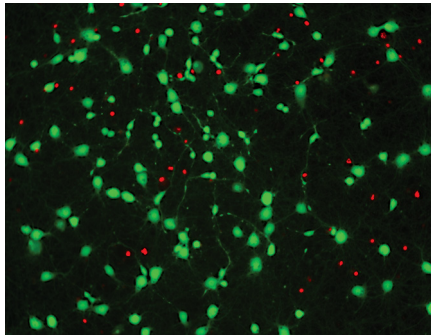


图 4. 使用 LIVE/DEAD 细胞活力/细胞毒性试剂盒中提供的钙黄绿素 AM 和 EthD-1 染色细胞并测定细胞活力。

ReadyProbes 细胞活力

成像试剂盒 (蓝/红)

双色细胞核染色活力检测

简介

该试剂盒支持快速轻松地测定细胞活力。Invitrogen™ NucBlue™ Live ReadyProbes™ 试剂可以染色所有细胞的细胞核，而碘化丙啶 (PI) 只能染色死细胞的细胞核。

试剂与耗材

- 在培养基中生长的细胞
- Invitrogen™ ReadyProbes™ 细胞活力成像试剂盒 (蓝色/红色) (货号 R37610)
- Invitrogen™ EVOS™ 成像系统 (配备 DAPI 和 RFP/TRITC 滤光片)

方案

- 在适当的培养基和容器中培养用于镜检的细胞。
- 向每毫升培养基中分别滴入 2 滴 NucBlue Live ReadyProbes 试剂和碘化丙啶 (PI) 来标记细胞。
- 孵育 5~30 min。
- 细胞成像。

重要说明

本方案可用于:

- 使用 Invitrogen™ EVOS™ 成像系统鉴别活细胞和死细胞

本方案不可应用于:

- 流式细胞术

小贴士

- 在某些情况下, 可能需要调整染料用量才能达到最佳染色强度。

光谱信息和储存条件		
Invitrogen™ 染料	NucBlue Live ReadyProbes 试剂	碘化丙啶
激发波长/发射波长	360/460 nm	528/617 nm
标准滤光片	DAPI	TRITC 或 RFP
EVOS 光立方	DAPI	TRITC 或 RFP
储存条件	室温	室温

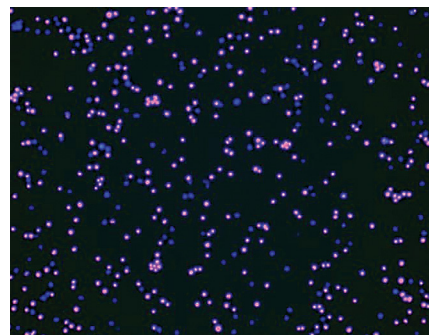


图 5. 使用 ReadyProbes 细胞活力成像试剂盒测定 Jurkat 细胞活力。

细胞分析

细胞结构



MitoTracker

线粒体选择性探针

简介

MitoTracker 探针是一种可渗透细胞膜的线粒体染料，含有一个温和的巯基反应性氯甲基团。孵育后，MitoTracker 染料被动扩散穿过质膜并积聚在活细胞的线粒体中。这些染料有多个波长范围可选，以用于多色实验中的线粒体定位。

试剂与耗材

- Invitrogen™ MitoTracker™染料 (货号 M7514、M7510、M7511、M7512、M7513、M22425 或 M22426)。各试剂的详细信息，请参阅用户手册。
- DMSO
- 缓冲液或生长培养基 (适用于活细胞成像)
- 可选: 醛类固定剂 (如适用于细胞固定的甲醛)
- 可选: 醛类去垢剂 (如 Triton™ X-100)

方案

制备母液

要制备母液，可将冻干 Invitrogen™ MitoTracker™ 线粒体选择性探针溶解在高质量无水二甲基亚砜 (DMSO) 中，终浓度为 1 mM；分子量 (MW) 标示在产品标签上。还原性罗萨明类 MitoTracker 探针 (货号 M7511, M7513) 非常容易氧化，尤其是在溶液中，所以必须在氩气或氮气环境，温度 $\leq -20^{\circ}\text{C}$ 下避光保存。二氢衍生物溶液制备完成后，应该立即使用。在 $\leq -20^{\circ}\text{C}$ 下，避光冷冻保存 MitoTracker 染料的所有其他溶液。

细胞制备和染色

探针的最佳染色浓度因用途而异。此处建议的初始条件是通用准则，可以根据特定细胞类型或其他因素 (如细胞或组织对探针的渗透性) 来调整。一般来说，还原性罗萨明类 MitoTracker 探针的添加浓度比其他 MitoTracker 探针高 3~5 倍。

重要说明

开盖前请先将试剂平衡至室温。

通用准则

使用 25~500 nM 工作浓度。对于待固定和破膜的染色细胞 (见“染色后的固定和破膜”)，使用 100~500 nM 工作浓度。为了减少过量染料带来的潜在假阳性和线粒体毒性，应将染料浓度保持在尽可能低的水平。对于 MitoTracker Green FM 探针，使用 20~200 nM 工作浓度。在较高浓度下，这些探针往往会染色其他细胞结构。

MitoTracker

线粒体选择性探针 (续)

制备染色液。在适当的缓冲液或生长培养基中稀释 1 mM MitoTracker 母液（见“制备母液”）到最终工作浓度。由于 MitoTracker 还原探针可能会被血清中的氧化酶氧化，因此我们不建议在完全培养基中染色。

- 1. 贴壁细胞染色。**在装有适当培养基的培养皿内的盖玻片上培养细胞。当细胞达到所需密度时，除去培养皿中的培养基，加入含 MitoTracker 探针的预热 (37°C) 染色液（在步骤 1 中制备）。在适合特定细胞类型的生长条件下孵育 15~45 min 通常就足够了，但可能需要根据具体情况优化。染色完成后，用新鲜的预热培养基或缓冲液替换染色液，并使用 Invitrogen™ EVOS™ 成像系统或荧光酶标仪观察细胞。如果要固定和破膜细胞，请继续阅读“染色后的固定和破膜”部分。
- 2. 悬浮细胞染色。**离心，获得细胞沉淀并吸取上清液。在含 MitoTracker 探针的预热 (37°C) 染色液（在步骤 1 中制备）中轻轻重悬细胞。在适合特定细胞类型的生长条件下孵育 15~45 min 通常就足够了，但可能需要根据具体情况优化。染色完成后，再次离心沉淀细胞，然后在新鲜的预热培养基或缓冲液中重悬。细胞可以通过调整或荧光显微镜来分析。如果需要在盖玻片上固定细胞，在封片前使用多聚赖氨酸来覆盖载玻片或盖玻片。如果要固定和破膜细胞，请继续阅读“染色后的固定和破膜”部分。

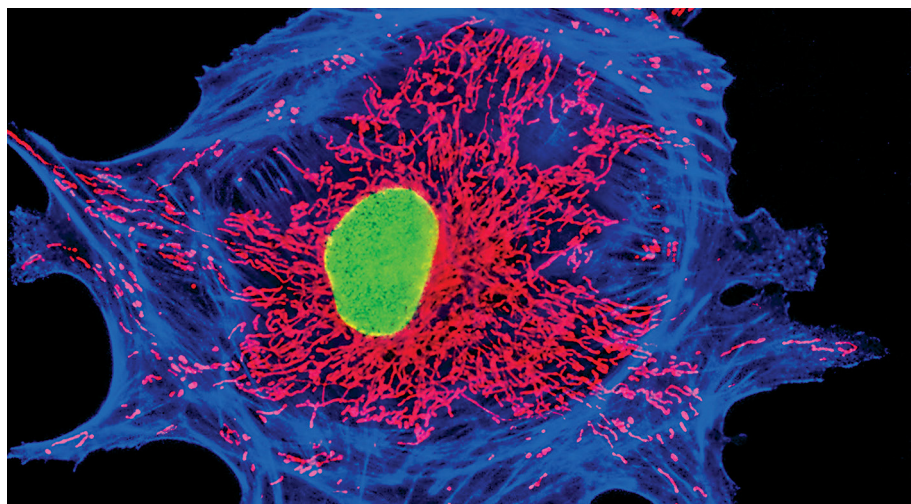


图 6.多色染色牛肺动脉内皮 (BPAC) 细胞。使用 Alexa Fluor 488 NPCP (Ms)、MitoTracker Red CMXRos 和 Alexa Fluor 350 鬼笔环肽染色细胞。

可选：染色后的固定和破膜

使用 MitoTracker 染料染色活细胞后，固定和破膜细胞对于后续操作通常很有用。使用此处描述的方案完成固定和破膜后，大多数 MitoTracker 染料都可以保留下来，而 MitoTracker Green FM 和 MitoTracker Red FM 无法很好地保留下来。

1. **洗涤细胞。**染色后，使用新鲜的预热缓冲液或生长培养基来洗涤细胞。

2. **固定细胞。**小心除去覆盖在细胞上的培养基/缓冲液，然后替换为新鲜制备的、含 2~4% 甲醛的预热缓冲液或生长培养基。对于 MitoTracker Red CMXRos，我们发现在完全生长培养基中使用 3.7% 甲醛 37°C 固定内皮细胞 15 min 的效果很好。

3. **冲洗细胞。**固定后，用缓冲液冲洗细胞多次。

4. **可选：细胞破膜。**如果免疫细胞化学等后续步骤需要细胞破膜，可在含去垢剂（如 Triton X-100）的缓冲液中孵育固定细胞。细胞破膜后，用缓冲液冲洗细胞，然后进入免疫细胞化学步骤。我们发现在含 0.2% Triton X-100 的 PBS 中孵育内皮细胞 10 min 的效果很好。或者，在冷丙酮中孵育 5 min，然后用 PBS 洗涤，使细胞破膜。

标记肌动蛋白的 鬼笔环肽试剂

简介

鬼笔环肽是一种从致命性鬼笔鹅膏“死帽菇”中分离出来的有毒双环肽，常用于成像应用，可以在固定细胞、破膜细胞和无细胞实验中选择性标记 F- 肌动蛋白。鬼笔环肽偶联物对大肌动蛋白丝和小肌动蛋白丝的亲和力相差不大，并且在肌肉和非肌肉细胞中，以每个肌动蛋白亚基约一个鬼笔毒素的化学计量比结合；据报道，鬼笔环肽偶联物不与单体 G- 肌动蛋白结合。

试剂与耗材

- 荧光或生物素鬼笔环肽 (见第 21 页的表格)
- DMSO (无水) (货号 D12345)
- PBS (1X, pH = 7.4) 或等效的成像级 PBS (货号 10010049)
- Invitrogen™ Image-iT™ 固定剂 (4% 甲醛, 无甲醇) (货号 FB002) 或等效的无甲醇甲醛固定剂
- 生物素结合偶联物, 如链霉亲和素或 NeutrAvidin™ 荧光或酶偶联物 (仅与 Biotin-XX 鬼笔环肽联用)
- 1-十六酰-sn-丙三醇-磷酸胆碱
- 可选: Triton™ X-100 Surfact-Amps™ 去垢剂 (货号 85112), 或等效的去垢剂, 或者成像级丙酮
- 可选: 牛血清白蛋白 (BSA) (货号 23209)
- 可选: Invitrogen™ Image-iT™ FX 信号增强剂 (货号 I36933)
- 可选: Invitrogen™ BlockAid™ 封闭剂 (货号 B10710)
- 可选: DNA 复染剂 (以下任一) 或等效的复染剂:
 - Invitrogen™ NucBlue™ 固定细胞 ReadyProbes™ 试剂 (货号 R37606)
 - Invitrogen™ SYTOX™ Deep Red 核酸染料 (货号 S11381)
- 可选: Invitrogen™ ProLong™ Glass 抗淬灭封片剂 (货号 P36980) 或等效的封片剂

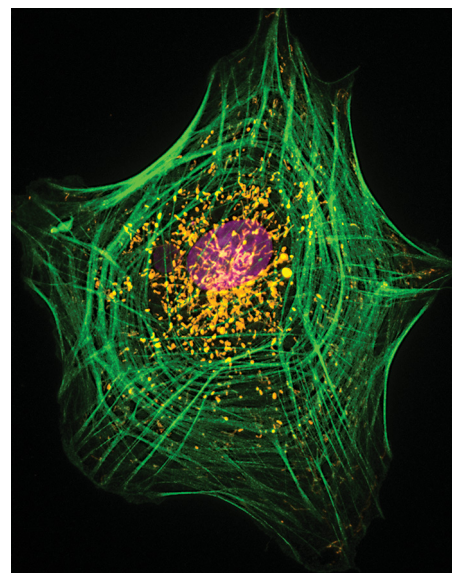


图 7. 经过固定、破膜和标记的麂皮成纤维细胞。使用小鼠抗 OxPhos 复合物 V 抑制剂蛋白抗体标记线粒体, 并使用橙色荧光 Invitrogen™ Alexa Fluor™ 555 山羊抗小鼠 IgG 抗体 (货号 A21422) 标记线粒体。使用绿色荧光 Invitrogen™ Alexa Fluor™ 488 鬼笔环肽 (货号 A12379) 标记 F-肌动蛋白, 并使用 Invitrogen™ TO-PRO™-3 碘化物 (货号 T3605, 品红色伪彩) 染色细胞核。

货号	规格	偶联物	激发波长 ¹	发射波长 ¹	近似分子量
A22281	300 U	Alexa Fluor™ 350 鬼笔环肽	346	442	1,100
A30104	300 U	Alexa Fluor™ Plus 405 鬼笔环肽	405	450	1,010
A12379	300 U	Alexa Fluor™ 488 鬼笔环肽	495	518	1,320
F432	300 U	荧光素鬼笔环肽	496	516	1,175
O7466	300 U	Oregon Green™ 488 鬼笔环肽	496	520	1,180
O7465	300 U	Oregon Green™ 514 鬼笔环肽	511	528	1,281
A22282	300 U	Alexa Fluor™ 532 鬼笔环肽	531	554	1,350
R415	300 U	罗丹明鬼笔环肽	540	565	1,250
A22283	300 U	Alexa Fluor™ 546 鬼笔环肽	556	570	1,800
A34055	300 U	Alexa Fluor™ 555 鬼笔环肽	555	565	1,910
A30106	300 U	Alexa Fluor™ Plus 555 鬼笔环肽	555	565	1,488
B3475	300 U	BODIPY™ 558/568 鬼笔环肽	558	569	1,115
A12380	300 U	Alexa Fluor™ 568 鬼笔环肽	578	600	1,590
A12381	300 U	Alexa Fluor™ 594 鬼笔环肽	581	609	1,620
T7471	300 U	Texas Red™ X 鬼笔环肽	591	608	1,490
A22284	300 U	Alexa Fluor™ 633 鬼笔环肽	632	647	1,900
A34054	300 U	Alexa Fluor™ 635 鬼笔环肽	633	647	1,850
A22287	300 U	Alexa Fluor™ 647 鬼笔环肽	650	668	1,950
A30107	300 U	Alexa Fluor™ Plus 647 鬼笔环肽	650	668	1,514
A22284	300 U	Alexa Fluor™ 660 鬼笔环肽	663	690	1,750
A22286	300 U	Alexa Fluor™ 680 鬼笔环肽	679	702	1,850
A30105	300 U	Alexa Fluor™ Plus 750 鬼笔环肽	758	784	2,122
B7474	50 U	生物素-XX 鬼笔环肽	NA	NA	1,300
P3457	1 mg	鬼笔环肽 (未标记)	NA	NA	790

¹ 近似荧光激发波长/发射波长最大值, 单位为 nm。请访问 thermofisher.cn, 获取具体的光谱信息。

方案

制备荧光素鬼笔环肽

使用以下任一方法制备荧光鬼笔环肽的母液。

- DMSO 母液 (推荐):** 在 150 μL 无水 DMSO 中溶解整瓶荧光鬼笔环肽, 制成浓度约为 66 μM 的 400X 母液, 每 mL 母液可用于 2,000 次检测。

DMSO 母液储存在 ≤-20°C 下时, 可稳定至少一年。该溶液已经过 5 次冻融循环的稳定性测试。如果需要额外的冻融循环, 可分装母液。

说明

在细胞培养的标准实验条件下, 与乙醇溶剂和水溶剂相比, 在无水 DMSO 中制备母液获得的染色强度更高, F-肌动蛋白结构完整性保留得也更好。

说明

一个单位/一次检测的荧光鬼笔环肽相当于 0.5 μL DMSO 母液。

本方案在第 22 页继续

标记肌动蛋白的鬼笔环肽试剂 (续)

- **甲醇母液:** 在 1.5 mL 甲醇中溶解整瓶荧光鬼笔环肽, 制成浓度约为 6.6 μM 的 40X 母液, 每 mL 母液可用于 200 次检测。

制备生物素-XX 鬼笔环肽

- 在 0.5 mL 甲醇中溶解整瓶生物素-XX 鬼笔环肽, 终浓度为 100 个单位或次检测/mL, 相当于约 20 μM 。

染色甲醛固定的细胞

该方案描述了生长在玻璃盖玻片上的贴壁细胞的染色流程。

1. 用预热 PBS 洗涤样品 2 次。
2. 在用 PBS 配制的 3.7% 甲醛 (无甲醇) 溶液中室温固定细胞样品 15 min。
3. 用 PBS 洗涤细胞样品两次或更多次。
4. 在用 PBS 配制的 0.1% Triton X-100 中破膜细胞样品 15 min。
5. 用 PBS 洗涤细胞样品两次或以上。
6. 可选: 使用抗体进行多通道测定时, 在 BlockAid 封闭剂 (货号 B10710) 或含 1% BSA 的等效封闭剂中室温孵育细胞样品 30~45 min。我们提供广泛的高质量抗体组合, 请访问 thermofisher.cn/antibodies 了解详情。
7. 可选: 在 Image-iT FX 信号增强剂 (货号 I36933) 中孵育细胞样品 20~30 min, 可增强信号。注意: 如果需要抗体染色, 可根据厂商的方案, 在步骤 7 和步骤 8 之间分别孵育一抗和二抗。使用鬼笔环肽标记样品可以与二抗染色相结合。确保正确稀释染色液中使用的每种试剂。

说明

一个单位/一次检测的荧光鬼笔环肽相当于 5 μL 甲醇母液。

说明

- 与荧光鬼笔环肽相比, 应使用更高浓度的 Invitrogen™ 生物素-XX 鬼笔环肽来染色细胞。
- 使用生物素-XX 鬼笔环肽染色的细胞需要荧光或酶标记亲和素或链霉亲和素检测试剂。

说明

一个单位/一次检测的生物素-XX 鬼笔环肽相当于 10 μL 甲醇母液。

步骤 2 的重要说明

避免使用含甲醇的固定剂。甲醇可以在固定过程中破坏肌动蛋白。

我们建议使用不含甲醇的甲醛, 如 Image-iT 固定剂 (4% 甲醛, 不含甲醇) (货号 FB002)。

步骤 4 的说明

某些细胞样品可能需要在 $\leq -20^{\circ}\text{C}$ 下, 在培养皿中的丙酮溶液中破膜。

说明

此处描述的染色方案与用于 ICC、IHC 或 FISH 的大多数信号放大技术 (如 Invitrogen™ 酪胺 SuperBoost™ 信号放大) 兼容。

8. 按照下表所示制备染色液。

染色液	制备流程
荧光鬼笔环肽染色液	<div>1. 稀释母液。<div><div>• 如果是 DMSO 母液, 在 200 μL PBS 中稀释 0.5 μL 400X DMSO 母液, 用于一个要染色的盖玻片。</div><div>• 如果是甲醇母液, 在 200 μL PBS 中稀释 5 μL 40X 甲醇母液, 用于一个要染色的玻片。</div></div></div> <div>2.添加 1% 牛血清白蛋白 (BSA), 减少非特异性背景染色。</div>
生物素-XX 鬼笔环肽染色液	<div>1. 在 200 μL PBS 中稀释 10 μL 甲醇母液, 用于一个要染色的玻片。</div> <div>2. 添加 1% 牛血清白蛋白 (BSA), 减少非特异性背景染色。</div>

按照下方所示在染色液中孵育样品:

如果是**荧光鬼笔环肽**, 向每个盖玻片上添加荧光鬼笔环肽染色液, 然后在室温下孵育 30~60 min。将盖玻片放在有盖容器中, 防止溶液在孵育过程中蒸发。

如果是**生物素—XX 鬼笔环肽**, 向每个盖玻片上添加生物素-XX 鬼笔环肽染色液, 然后在室温下孵育 15 min。

9. 可选: 如果需要, 添加 DNA 复染剂, 如 NucBlue 固定细胞 ReadyProbes 试剂 (货号 R37606) 或 SYTOX Deep Red 核酸染料 (货号 S11381), 分别用于固定细胞或死细胞。
10. 用 PBS 洗涤细胞样品两次或以上。
11. 如需长期储存, 可将细胞样品封片在固化或硬质水性封片剂中, 如 ProLong Glass 抗淬灭封片剂 (货号 P36980)。用这种方式制备的样品在 2~6°C 的避光环境中储存时, 可保持肌动蛋白染色至少六个月。

说明

染色多个玻片时, 应相应调整染色液体积。要获得更强的信号, 每个玻片使用 2~3 倍以上的染色液。

说明

如果使用的是生物素-XX 鬼笔环肽, 请按照特异酶的推荐流程来确保酶活性。例如, 在 100 mM Tris-HCl (pH = 7.5)、150 mM NaCl、0.3% Triton X-100 和 1% BSA 中制备 10 μ g/mL 荧光或酶标记链霉亲和素溶液。制备充足溶液, 在每个盖玻片上添加 100 μ L。向每个玻片添加 100 μ L 荧光或酶标记链霉亲和素溶液, 然后在室温下孵育 30 min。

重要说明

不要使用含有机溶剂的封片剂。

说明

如果样品未封片, 或使用非硬质封片剂封片, 强烈建议立即成像细胞。鬼笔环肽偶联物的信号强度会随着储存时间的增加而衰减。储存期间的信号衰减率可能因所用的偶联物类型、封片剂或储存温度而异。实验表明, 封片在 Invitrogen™ SlowFade™ Diamond 抗淬灭封片剂或 Invitrogen™ SlowFade™ Glass 抗淬灭封片剂中的细胞可保持肌动蛋白染色长达两周或更长时间 (当在 -20°C 下储存并经过多次冻融时)。

标记肌动蛋白的鬼笔环肽试剂 (续)

同时固定、破膜和染色细胞

鬼笔环肽在 4% 甲醛固定缓冲液中只能稳定很短时间。下述为一步固定、破膜和标记方案的操作流程。

1. 制备 1 mL 含 50~100 $\mu\text{g/mL}$ 1-十六酰-sn-丙三醇-磷酸胆碱和 3.7% 甲醛 (无甲醇) 的溶液, 然后添加 25~50 μL 荧光鬼笔环肽甲醇母液。
2. 向样品中添加溶液, 然后在 4°C 下孵育 20 min。
3. 用 PBS 快速洗涤样品 3 次。
4. 封片, 然后成像细胞。

说明

我们建议在此流程中使用荧光鬼笔环肽甲醇母液。如需了解制备甲醇母液的更多信息, 请参阅第 21 页“制备荧光鬼笔环肽”。

CellLight BacMam 2.0 试剂

简介

Invitrogen™ CellLight™ BacMam 2.0 试剂提供了一种标记活细胞中的特定结构的简单方法。只需将即用型载体添加到细胞中，孵育过夜，然后在第二天成像细胞。这些载体表达靶向特定细胞内结构的荧光融合蛋白。荧光蛋白经过简单的转导步骤引入，其中使用的 BacMam 2.0 技术不同于传统的分子生物学技术——它的工作流程更像是给细胞染色。

试剂与耗材

- CellLight BacMam 2.0 试剂 (见下方选择指南)
- 细胞培养基
- 可选: 用 PBS 配制的 4% 甲醛
- 可选: 用 PBS 配制的 0.2% Triton X-100

方案

CellLight 试剂以 1×10^8 病毒颗粒/mL 的溶液形式提供。以下方案使用贴壁细胞进行了优化。在接种前，细胞也可以在悬浮液中被标记。

CellLight 荧光蛋白选择指南			
激发波长范围 (nm)	GFP 488–510	RFP 555–584	CFP 435–485
肌动蛋白	C10582	C10583	—
细胞质	B10383	—	—
内质网	C10590	C10591	—
早期核内体	C10586	C10587	—
晚期核内体	C10588	C10589	—
高尔基体	C10592	C10593	—
组蛋白 (组蛋白 2B)	C10594	—	—
溶酶体	C10596	C10597	—
线粒体	C10600	C10601	—
细胞核	C10602	C10603	—
过氧化物酶体	C10604	—	—
质膜	C10607	C10608	C10606
踝蛋白	C10611	C10612	—
微管蛋白	C10613	C10614	—
BacMam 2.0 转染对照	B10383	—	—
非偶联			
空病毒 (对照)	C10615		

本方案在第 26 页继续

通用准则

- CellLight 试剂适用于大多数细胞类型，其中每个细胞的颗粒数 (PPC) 为 10~50。
- 要获得最佳结果，应在融汇度不超过 70% 的情况下转染细胞。
- CellLight BacMam 2.0 试剂通常不需要 Invitrogen™ BacMam 增强剂试剂盒 (货号 B10107)。然而，该试剂盒的使用已被证明可以促进一些具有挑战性的细胞类型 (如 Jurkat) 的表达。
- 要获得最佳结果，可能需要调整 PPC、体积、细胞密度、温度或孵育时间。调整 PPC 后，调整体积是改变并优化蛋白质表达的下一个最佳参数。

CellLight BacMam 2.0 试剂 (续)

第 1 天标记

1. 按照所需密度接种细胞, 并让细胞有足够的时间贴壁。CellLight BacMam 试剂在低传代数细胞上使用效果最佳。
2. 计算细胞数对应的 CellLight 试剂体积。

$$\text{CellLight 试剂体积 (mL)} = \frac{\text{细胞数} \times \text{所需 PPC}}{1 \times 10^8 \text{ CellLight 颗粒/mL}}$$
3. 倒置多次来混匀 CellLight 试剂, 确保溶液均一。切勿涡旋混匀。
4. 将步骤 2 中计算出的 CellLight 试剂体积直接添加到完全细胞培养基的细胞中, 轻轻混匀。
5. 将细胞放回培养箱中过夜 (≥ 16 h)。

第 2 天成像

1. 使用适当的仪器滤光片组来成像细胞。

可选: 可以使用甲醛固定细胞。要固定细胞, 可使用 PBS 配制的 4% 甲醛溶液室温处理细胞 10~30 min。固定细胞后, 可使用 PBS 配制的 0.2% Triton X-100 溶液室温破膜细胞 5 min。

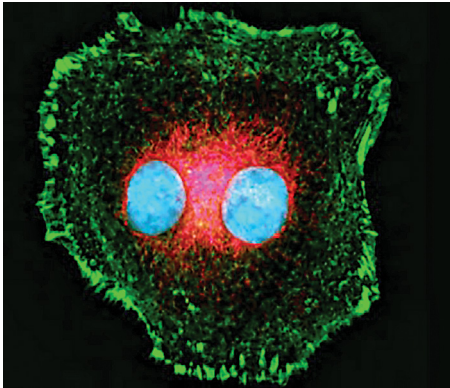


图 8.使用 CellLight 试剂标记 HeLa 细胞。使用 Invitrogen™ CellLight™ 线粒体-RFP 试剂 (货号 C10505) 和 Invitrogen™ CellLight™ 踝蛋白-GFP 试剂 (货号 C10611) 转导 HeLa 细胞 24 h, 然后使用 Invitrogen™ NucBlue™ 活细胞 ReadyProbes™ 试剂 (货号 R37605) 标记 HeLa 细胞 15 min。为了减少光漂白, 在使用 Invitrogen™ EVOS™ 细胞成像系统成像细胞之前, 将细胞与 Invitrogen™ ProLong™ Live 抗淬灭试剂一起孵育 90 min。

说明

甲醇固定过程可能会使荧光消失。如果下游分析需要甲醇固定, 可以使用抗 GFP 抗体检测 GFP 蛋白, 或抗 RFP 抗体检测 RFP。请访问 thermofisher.cn/antibodies 了解详情。

Tubulin Tracker 试剂

简介

Invitrogen™ Tubulin Tracker™ 试剂可荧光染色活细胞中的聚合微管蛋白。该试剂经过专业设计，可以轻松进入活细胞，从而提供比其他检测方法更均一的标记和更优的选择性。

试剂与耗材

- Tubulin Tracker 试剂 (货号 T34075、T34076、T34077、T34078、T34079)
- 活细胞 (如培养细胞或原代细胞、3D 细胞培养物、球状体或类器官)
- Invitrogen™ 无水 DMSO (货号 D12345)
- 活细胞兼容缓冲液：
 - Gibco™ HBSS (含钙和镁) (货号 24020117)
 - Gibco™ FluoroBrite™ DMEM (货号 A1896701)
- 可选: Invitrogen™ 水溶性丙磺舒 (货号 P36400)
- 可选: Invitrogen™ Pluronic™ F-127 (20%的DMSO溶液) (货号 P3000MP)
- 可选: Invitrogen™ NucBlue™ 活细胞 ReadyProbes™ 试剂 (货号 R37605)

方案

使用 Tubulin Tracker Green试剂制备并染色细胞

1. 涡旋混匀中间母液，请参阅“开始之前”部分。
2. 在活细胞兼容缓冲液中稀释中间母液至 1X。某些细胞类型可以使用较低浓度。仅使用当天制备的新鲜溶液。
3. 添加足量的最终染色液，覆盖粘附在容器上的细胞。

本方案在第 28 页继续

流程指南

- 我们建议本实验方案可作为实验起点，每种细胞类型的最佳标记条件应根据经验来确定。
- Pluronic F-127 溶液增强了活细胞中 Tubulin Tracker™ Green 荧光试剂的染色效果，但似乎没有增强 Tubulin Tracker™ Deep Red 荧光试剂的染色效果。为获得最佳结果，可在使用前涡旋混匀含 Pluronic F-127 的溶液。
- 丙磺舒可防止荧光试剂在许多活细胞类型中流出。为了尽量减少对其他细胞功能的脱靶效应，我们建议在使用 Tubulin Tracker Green 试剂和 Tubulin Tracker Deep Red 试剂标记和成像时，使用 1X 丙磺舒。不要在丙磺舒中孵育超过几个小时。

说明

开始之前:

- 在 15 μ L (货号 T34078) 或 75 μ L (货号 T34075) 无水 DMSO 中溶解整瓶 Tubulin Tracker Green 试剂，制成 4,000X Tubulin Tracker Green 试剂母液。该母液在 $\leq -20^{\circ}\text{C}$ 下时，可至少稳定保存 3 个月。
- 仅适用于 Tubulin Tracker™ Green 试剂: 向 Tubulin Tracker™ Green 母液中加入等量的 Pluronic F-127 (20%的DMSO溶液)。该 2,000X 中间母液在 $\leq -20^{\circ}\text{C}$ 下时，可稳定保存 14 天。
- 在 60 μ L 无水 DMSO 中溶解整瓶 Tubulin Tracker Deep Red 试剂，制成 1,000X Tubulin Tracker Deep Red 试剂母液。该母液储存在 $\leq -20^{\circ}\text{C}$ 下时，可稳定至少 3 个月。
- 在 1 mL 活细胞兼容缓冲液中溶解丙磺舒，制成 100X 储存液。该溶液在 $\leq -20^{\circ}\text{C}$ 下时，可稳定储存 6 个月。

Tubulin Tracker 试剂 (续)

4. 在 37°C 和 5% CO₂ 下孵育 30 min。可选: 可以添加 1X 细胞核染色剂。染色 3D 细胞培养物 (如球状体或类器官) 时, 建议使用相同的最终染色浓度, 但要延长孵育时间, 使染色剂完全渗透。
5. 在 37°C 下, 用活细胞兼容的清洗缓冲液洗涤细胞 3 次。
可选: 向清洗缓冲液中加入 1X 丙磺舒, 尽量减少探针在冲洗和成像步骤中流出。不要将细胞放在丙磺舒中超过 2 h, 因为丙磺舒会干扰某些细胞功能。
6. 成像和分析缓冲液中的细胞。细胞样品应在染色后几小时内观察, 因为染色强度会随着时间的推移而减弱。

使用 Tubulin Tracker Deep Red 制备和标记细胞样品

1. 在活细胞兼容缓冲液中稀释母液至 1X。某些细胞类型可以使用较低浓度。仅使用当天制备的新鲜溶液。
2. 添加足量的染色液, 覆盖粘附在容器上的细胞。
3. 在 37°C 和 5% CO₂ 下孵育 30 min。可选: 可以添加 1X 细胞核染色剂。染色 3D 细胞培养物 (如球状体或类器官) 时, 建议使用相同的最终染色浓度, 但要延长孵育时间, 使染色剂完全渗透。
4. 在 37°C 下, 用活细胞兼容清洗缓冲液洗涤细胞 3 次。
可选: 向清洗缓冲液中加入 1X 丙磺舒, 尽量减少探针在冲洗和成像步骤中流出。不要将细胞放在丙磺舒中超过 2 h, 因为丙磺舒会干扰某些细胞功能。
5. 成像和分析缓冲液中的细胞。细胞样品应在染色后几小时内观察, 因为染色强度会随着时间的推移而减弱。

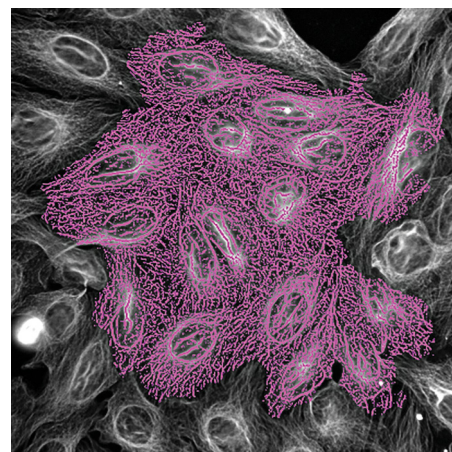


图 9.使用 Tublin Tracker Deep Red 试剂标记的细胞。

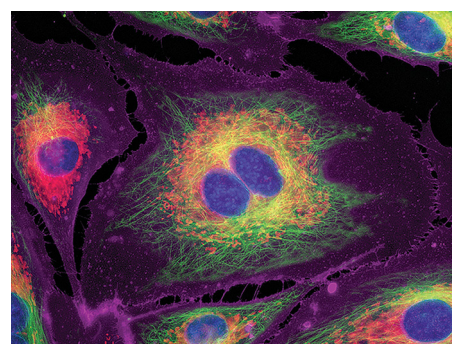


图 10.使用 Invitrogen™ CellMask™ Deep Red 质膜染料标记活细胞。使用 CellMask Deep Red 质膜染料 (货号 C10046)、微管蛋白选择性 Tubulin Tracker Green 染料 (Oregon Green™ 488 紫杉醇、双乙酸酯) (货号 T34075)、线粒体选择性 MitoTracker Red CMXRos 染料 (货号 M7512) 和蓝色荧光 Hoechst 33342 细胞核染料 (货号 H21492) 标记牛肺动脉内皮活细胞。然后, 使用标准荧光显微镜成像已标记的细胞, 并使用 Huygens 软件 (Scientific Volume Imaging, SVI) 去卷积图像。

LysoTracker 和 LysoSensor 探针

简介

Invitrogen™ LysoTracker™ 染料是一种细胞通透性溶酶体标记物，可靶向和追踪活细胞中的酸性细胞器。LysoTracker 标记物包含与弱碱性胺结合的荧光基团。虽然 LysoTracker 的滞留机制相对不清楚，但很可能是由于质子化而保留在细胞器的膜上。这些溶酶体标记物积聚在 pH 值低的细胞器中，在中性 pH 值下仅部分质子化。

试剂与耗材

- Invitrogen™ LysoTracker™ 或 LysoSensor™ 染料 (货号 L7525、L12491、L7526、L7528、L12492、L7533、L7535、L7545、L22460)
- 生长培养基或缓冲液

方案

LysoTracker 和 LysoSensor 染料

1. 在所选生长培养基或缓冲液中稀释 1 mM 探针母液至最终工作浓度。如果是 LysoTracker 探针，我们建议工作浓度为 50~75 nM；如果是 LysoSensor 探针，我们建议工作浓度至少为 1 μM。为了减少过量染料带来的假阳性，应将染料浓度保持在尽可能低的水平。
2. 如果是贴壁细胞，在装有适量培养基的培养皿内的盖玻片上培养细胞。当细胞达到所需汇合度时，除去培养皿中的培养基，加入含探针的预热 (37°C) 培养基。在适合细胞生长的条件下孵育 30 min 至 2 h。然后，将上清替换为新鲜培养基，并使用配备了适当滤光片的 Invitrogen™ EVOS™ 成像系统观察细胞。如果细胞染色不充分，我们建议增加标记浓度或增加染料在溶酶体中积聚的时间。

本方案在第 30 页继续

重要说明

开盖前请先将试剂平衡至室温，然后在桌面离心机中短暂离心，使其沉积在底部。

说明

探针的最佳染色浓度因用途而异。染色条件需要根据细胞类型和细胞或组织对探针的渗透性来调整。

说明

如果细胞染色后在无染料培养基中孵育，通常会观察到荧光信号减少和细胞起泡。

说明

Invitrogen™ LysoTracker™ Green DND-26 和 Invitrogen™ LysoSensor™ Yellow/Blue DND-160 (PDMPO) 探针内化的动力学研究表明，这些染料数秒内就能进入活细胞。遗憾的是，这些溶酶体探针会对溶酶体表现出“碱化作用”，因此与这些探针一起孵育较长时间会导致溶酶体 pH 值增加。我们认为，这些探针只有在 37°C 下与细胞一起孵育 1~5 min 时才是有效的 pH 指示剂。

LysoTracker 和 LysoSensor 探针 (续)

3. 如果是悬浮细胞, 离心、获得细胞沉淀并去除上清液。在含探针的预热 (37°C) 培养基中轻轻重悬细胞。在适合细胞类型的生长条件下孵育细胞 30 min 至 2 h (关于这些探针的内化速率, 见上述说明)。再次离心, 将细胞重新沉淀, 然后在新鲜的预热培养基中重悬。使用配备了适当滤光片组的 EVOS 成像系统观察细胞。如果细胞没有被充分染色, 我们建议增加标记浓度或增加染料在溶酶体中积聚的时间。

LysoSensor Yellow/Blue 葡聚糖

1. 要制备母液, 可将冻干 Invitrogen™ LysoSensor™ Yellow/Blue 葡聚糖在磷酸盐缓冲液 (pH = 7.4) 中复溶至 50 mg/mL。在 -20°C 或更低温度下避光储存母液。
2. 在所选生长培养基或缓冲液中稀释母液至最终工作浓度。我们建议工作浓度为 1~5 mg/mL。
3. 如果是贴壁细胞, 在装有适量培养基的培养皿内的盖玻片上培养细胞。当细胞达到所需密度时, 除去培养皿中的培养基, 加入预热 (37°C) 的葡聚糖工作溶液。在适合细胞类型的生长条件下孵育细胞 1~24 h, 然后继续实验。将上清替换为新鲜培养基, 并使用配备了适当滤光片的荧光显微镜观察细胞。
4. 如果是悬浮细胞, 离心、获得细胞沉淀并去除上清液。在含葡聚糖的预热 (37°C) 培养基中轻轻重悬细胞。在适合细胞类型的生长条件下孵育细胞 1~24 h。再次离心沉淀细胞, 然后在新鲜的预热培养基中重悬。使用配备适当滤光片组的 EVOS 成像系统观察细胞。

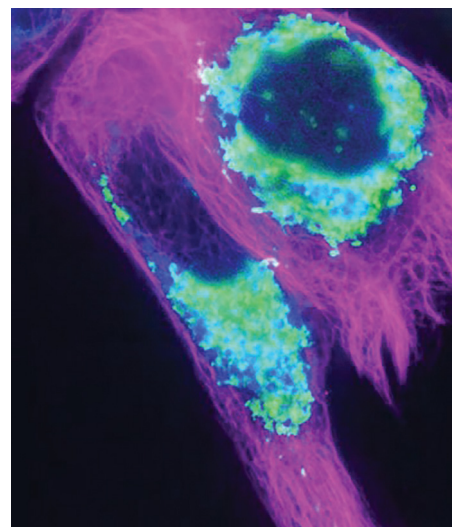


图 11. 使用 LysoTracker、MitoTracker 和 Tubulin Tracker 试剂标记 U2OS 细胞。使用 Invitrogen™ LysoTracker™ Blue DND-22 染料 (货号 L7525)、Invitrogen™ MitoTracker™ Green FM 染料 (货号 M7514) 和 Invitrogen™ Tubulin Tracker™ Deep Red 染料 (货号 T34076) 标记的 U2OS 细胞显示出极好的多通道测定能力和染色特异性。向含钙和镁的 Gibco™ HBSS 缓冲液 (货号 14025134) 中添加 1X Invitrogen™ 丙磺舒溶液 (货号 P36400), 然后成像细胞。使用 Invitrogen™ EVOS™ 成像系统生成图像。

ER-Tracker 染料： 用于活细胞内质网标记

简介

Invitrogen™ ER-Tracker™ 染料是一种高选择性、细胞通透性活细胞内质网染料。在低浓度下，这些染料未显示出细胞毒性。当使用提供的方案进行细胞染色时，在甲醛固定后，内质网（ER）染色会部分保留。

Invitrogen™ ER-Tracker™ Blue-White DPX 染料（货号 E12353）具有高选择性和光稳定性。其激发波长约为 374 nm，由于对环境敏感，发射波长范围为 430~640 nm。虽然标准 DAPI 滤光片效果最好，通常也推荐使用，但在观察内质网染色时建议使用 UV 长通滤光片。

Invitrogen™ ER-Tracker™ Green（BODIPY™ FL 格列本脲，货号 E34251）和 Invitrogen™ ER-Tracker™ Red（BODIPY™ TR 格列本脲，货号 E34250）是荧光磺酰脲类染料。这些内质网染料使用的格列本脲会与内质网上高丰度的 ATP 敏感 K^+ 通道的磺酰脲类受体结合；然而，这些受体的分布可能取决于组织和细胞类型。值得注意的是，格列本脲的药理活性可能会影响内质网功能。

试剂与耗材

- ER-Tracker 染料
- DMSO
- Gibco™ Hanks 平衡盐溶液 (HBSS; 含钙和镁, 无酚红) (货号 14025-092)
- 可选: 4% 甲醛
- 可选: 0.2% Triton X-100

方案

该方案使用牛肺动脉内皮细胞进行了优化，并已在其他常见细胞系中得到证实。我们建议本实验方案可作为实验起点，每种细胞类型的最佳标记条件应根据经验确定。

ER-Tracker 染料:

用于活细胞内质网标记 (续)

试剂制备

ER-Tracker Blue-White DPX 染料以用 DMSO 配制的 1 mM 母液形式提供。在使用前, 将各管试剂平衡到室温, 然后短暂离心, 将 DMSO 溶液沉积在小瓶的底部。

ER-Tracker Green 染料和 ER-Tracker Red 染料以 100 µg 冻干粉形式提供。制备所需染料的 1 mM 母液: 如果是 ER-Tracker Green 染料, 在 128 µL DMSO 中溶解整瓶染料; 如果是 ER-Tracker Red 染料, 在 110 µL DMSO 中溶解整瓶染料。建议将 1 mM 母液分装后用干燥剂冷冻储存。

细胞制备和染色

- 1. 制备染色液。**稀释 1 mM 母液至最终工作浓度。如果是 ER-Tracker Blue-White DPX 染料, 我们建议工作浓度为 100 nM~1 µM; 如果是 ER-Tracker Green 染料和 ER-Tracker Red 染料, 我们建议工作浓度约为 1 µM。为了尽量减少潜在的假阳性, 使用的染料浓度应尽可能低。在 37°C 和 5% CO₂ 下, 在含钙和镁的 Hanks 平衡盐溶液 (HBSS) 中染色可获得最佳结果。
- 2. 染色细胞。**如果是贴壁细胞, 除去培养皿中的培养基, 用 HBSS 冲洗, 再加入预热染色液。在 37°C 下孵育细胞约 15~30 min。将染色液替换为新鲜的无探针培养基, 并使用 Invitrogen™ EVOS™ 成像系统观察细胞。如果要固定已染色的细胞, 请参阅下方相应染料的固定步骤。

ER-Tracker Blue-White DPX 染料的固定和破膜

- 3. 固定和破膜细胞。**经过甲醛固定后, ER-Tracker Blue-White DPX 染料的信号仅部分保留。在 37°C 下用 4% 甲醛固定已染色的细胞 10~20 min。如果要进行其他染色, 可以用 0.2% Triton X-100 溶液破膜细胞 10 min。
- 4. 洗涤和观察细胞。**细胞固定后, 用任何适当的缓冲液洗涤细胞 2 次, 每次 5 min, 然后观察。

ER-Tracker Green 和 ER-Tracker Red 染料的固定

1. **固定细胞。**如果要固定已染色的细胞, 建议在 37°C 下用 4% 甲醛固定 2 min。
2. **洗涤和观察细胞。**细胞固定后, 用适当的缓冲液洗涤细胞 2 次, 每次 5 min, 然后再封片、观察或进一步染色。不建议破膜; 用 Triton X-100 溶液破膜后信号无法保留。

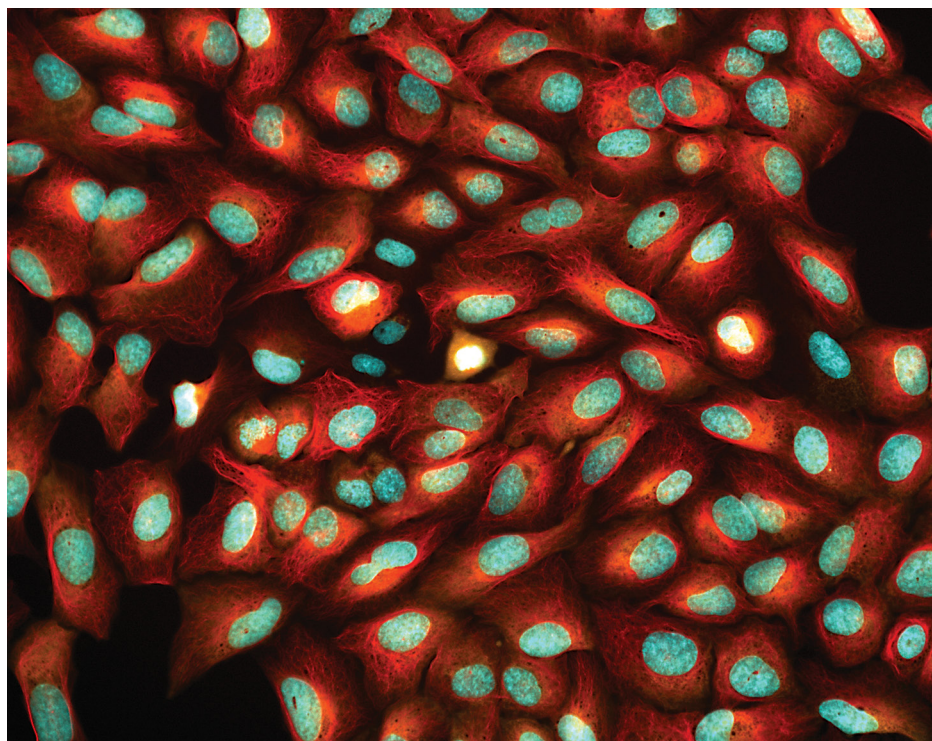


图 12.使用 ER-Tracker 染料标记 HeLa 细胞。与过表达的荧光融合蛋白相比, 使用 NucBlue™ 活细胞 ReadyProbes™ 试剂 (货号 R37605)、ER-Tracker Green 染料 (货号 E34251) 和 Tubulin Tracker Deep Red 染料 (货号 T34076) 标记的 HeLa 细胞显示出极好的多通道兼容性和染色均一性。向含钙和镁的 HBSS 缓冲液 (货号 14025134) 中添加 1X 丙磺舒溶液 (货号 P36400), 然后成像细胞。使用 EVOS 成像系统生成图像。

SelectFX 细胞核标记试剂盒

用于标记已固定的细胞核, 包括 DAPI、SYTOX Green、7-AAD 和 TO-PRO-3 染料

简介

Invitrogen™ SelectFX™ 细胞核标记试剂盒 (货号 S33025) 提供了四种不同光谱的荧光染料包括蓝色荧光 DAPI、绿色荧光 Invitrogen™ SYTOX™ Green 染料、红色荧光 7-氨基放线菌素 D (7-AAD) 和远红色荧光 Invitrogen™ TO-PRO™-3 染料, 用于染色固定细胞中的细胞核。这些染料非常适合在多色应用中用作复染剂, 只需选择与应用于样品的其他荧光探针在光谱上兼容的染料。按照提供的方案使用时, SelectFX 细胞核标记试剂盒中的染料可提供高选择性的细胞核染色, 细胞质不会或极少被染色。当使用荧光显微镜观察时, 染色的细胞核与其他荧光标记的细胞结构形成鲜明对比。这些染料的激发波长与共聚焦显微镜和流式细胞仪的常用激光波长相同, 可与 Invitrogen™ EVOS™ 成像系统和酶标仪上的标准滤光片一起使用。

试剂与耗材

- SelectFX 细胞核标记试剂盒 (货号 S33025)
- 磷酸盐缓冲液 (PBS)
- 蒸馏水
- 4% 甲醛
- 用 PBS 配制的 0.2% Triton X-100
- 封片剂

方案

荧光显微镜实验方案

下述方案是针对固定在 4% 甲醛溶液中的牛肺动脉上皮细胞进行的优化, 但仍与其他细胞类型兼容。其他固定方法可能会导致非特异性染色或细胞形态异常。染色前 RNA 酶处理样品不是必需的, 但在某些条件下可以改善 SYTOX Green 或 TO-PRO-3 染料染色的信噪比, 特别是在需要更高浓度染料的情况下。如果要将这些染料作为核复染剂, 应先进行其他染料的染色。DAPI 和 TO-PRO-3 染料最好在磷酸盐缓冲液 (PBS) 中制备, 而 SYTOX Green 染料和 7-AAD 最好在蒸馏水中制备。可以使用其他缓冲液, 但细胞质背景和非特异性染色可能会增加。

本方案在第 35 页继续

通用染色方案

1. **固定细胞。**在 37°C 下, 使用含 4% 甲醛的完全培养基固定贴壁细胞或悬浮细胞 15 min。

2. **洗涤细胞。**用 PBS 洗涤细胞 5 min, 重复 2 次。

3. **破膜细胞。**使用 PBS 配制的 0.2% Triton X-100 溶液破膜细胞 10 min。

4. **冲洗细胞。**用 PBS 充分冲洗细胞。

5. 可选: 标记非核结构。如果要使用其他染料, 请继续执行标记和清洗步骤。

6. **使用复染剂。**如果准备染色细胞核, 请遵循所用染料的指南:

DAPI: 在 PBS 中稀释 (稀释比例为 1:300) DAPI 母液 (组分 A), 制成 0.2 µg/mL (600 nM) 溶液。在细胞上覆盖足量的 600 nM 溶液, 然后孵育 2 min。继续执行步骤 7。

SYTOX Green染料: 在水中稀释 (稀释比例为 1:300) SYTOX Green染料母液 (组分 B), 制成 0.2 µg/mL (167 nM) 溶液。用水冲洗细胞, 然后在细胞上覆盖足量的 167 nM 溶液。孵育 15 min 后, 再次用水冲洗, 然后继续执行第 7 步中的最后一次洗涤。

7-AAD: 在水中稀释 (稀释比例 1:50) 7-AAD 母液 (组分 C), 制成 40 µg/mL (32 µM) 溶液。用蒸馏水冲洗细胞, 然后在细胞上覆盖足量的 32 µM 溶液。孵育 45 min 后, 再次用蒸馏水冲洗, 然后继续执行第 7 步中的最后一次洗涤。

TO-PRO-3 染料: 在 PBS 中稀释 (稀释比例为 1:300) TO-PRO-3 染料母液 (组分 D), 制成 0.7 µg/mL (1 µM) 溶液。在细胞上覆盖足量的 1 µM 溶液, 然后孵育 15 min。继续执行步骤 7。

7. **洗涤细胞。**用 PBS 洗涤细胞 5 min, 重复 2 次。

8. **准备观察。**用合适的封片剂进行封片, 如 Invitrogen™ ProLong™ Gold抗淬灭剂 (货号 P36930, P36934) 或 Invitrogen™ Slowfade™ Gold抗淬灭剂 (货号 S36936, S36937)。

Hoechst 染料

荧光显微镜观察细胞核复染

简介

Invitrogen™ Hoechst™ 33342 核酸染料是一种很受欢迎的细胞渗透性核复染剂，与 dsDNA 结合时会发出蓝色荧光。该染料常用于区分凋亡细胞中的凝聚固缩核，并与 BrdU 结合用于细胞周期研究。还有溶液形式提供（货号 H3570）。

试剂与耗材

- 在培养基中生长的细胞
- Hoechst 33342 (三盐酸盐, 三水合物) (货号 H1399)
- 磷酸盐缓冲液 (PBS)
- Invitrogen™ EVOS™ 成像系统

方案

制备 Hoechst 染料母液

1. 在 10 mL 去离子水 (dH_2O) 中溶解整瓶 Hoechst 染料 (100 mg)，制成 10 mg/mL (16.23 mM) Hoechst 染料母液。

标记细胞

1. 在合适的培养基和容器中培养待成像细胞。
2. 在 PBS 中稀释（稀释比例为 1:2,000）Hoechst 母液，制成 Hoechst 染色液。
3. 除去培养基。
4. 用足量的染色液覆盖细胞。
5. 避光孵育 5~10 min。
6. 可选：如果需要，可以直接在染色液中成像。

重要说明

本方案可用于：

- 使用荧光显微镜观察核酸（细胞核）染色

本方案不可应用于：

- 流式细胞术

小贴士

- Hoechst 染料是一种已知的诱变剂，应谨慎处理。
- 不建议在 PBS 中溶解 Hoechst 染料，但含磷酸盐的缓冲液可与染料的稀释溶液一起使用。
- 游离的 Hoechst 染料的最大发射波长在 510~540 nm 范围内；如果使用过量染料，可能会观察到绿雾。
- Hoechst 染料的荧光信号会被 BrdU 淬灭。

步骤 1 的说明

Hoechst 染料在水中的溶解度较差，因此有必要进行超声溶解。

步骤 1 的说明

在 2~6°C 下，10 mg/mL Hoechst 储存液可储存长达 6 个月，或在 -20°C 或更低温度下储存更长时间。

- 7. 除去染色液。
- 8. 用 PBS 洗涤细胞 3 次。
- 9. 使用EVOS成像系统进行细胞成像。

光谱信息和储存条件	
Invitrogen™ 染料	Hoechst 33342
激发波长/发射波长	350/461 nm
标准滤光片	DAPI
EVOS 光立方	DAPI
储存条件	2~6°C 或 ≤-20°C

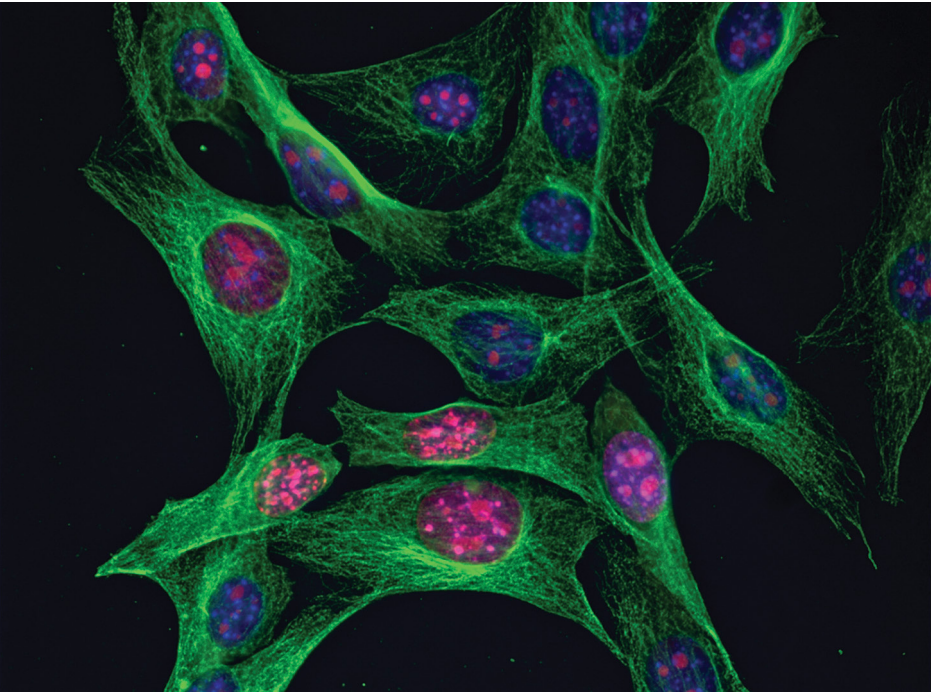


图 13.使用 Click-iT RNA 试剂盒进行多通道成像。NIH3T3 细胞与 1 mM EU 孵育 1 h，然后使用甲醛固定，Triton X-100 破膜。使用 Click-iT RNA Alexa Fluor 594 成像试剂盒 (货号 C10330) 检测结合到某些细胞中新合成 RNA (红色) 的 EU。使用小鼠抗微管蛋白 IgG (货号 A11126) 标记微管蛋白 (绿色)，并使用 Alexa Fluor 488 山羊抗小鼠 IgG (货号 A11001) 检测微管蛋白 (绿色)。使用 Hoechst 33342 (货号 H3570) 染色细胞核 (蓝色)。

SYTO 9 染料

简介

Invitrogen™ SYTO™ 9 Green 荧光核酸染料（货号 S34854）可以用于区分活的和死的革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌，在 Invitrogen™ LIVE/DEAD™ BacLight™ 细菌活力试剂盒（货号 L7007、L7012 和 L13152）中有提供。

试剂与耗材

- SYTO 9 Green 荧光核酸染料（货号 S34854）
- 非磷酸盐缓冲液,如 Hanks 平衡盐溶液（货号 14025092）

方案

培养物中的贴壁细胞可以在盖玻片上原位染色。

1. 通过离心使细胞在悬液中沉淀，然后在缓冲盐溶液或水中重悬。
2. 使用 SYTO 9 染料时，可以下表的浓度和染色条件作为参考。
3. 使用EVOS成像系统进行细胞成像。

SYTO Green 荧光核酸染料的建议染色条件		
应用	SYTO 9 染料浓度	染色条件
细菌细胞	50 nM–20 μM	涡旋混匀，然后孵育 1–30 min
真核细胞	10 nM–5 μM	孵育 10–120 min

SYTO 9 染料的光谱信息和储存条件	
激发波长/发射波长	485/498 nm
标准滤光片	FITC
EVOS 光立方	GFP
储存条件	<–20°C

方案指南

- 根据我们的实验经验和已发表实验方法，建议使用较宽的染色浓度范围作为实验起点。这些条件需要根据每种细胞类型和实验系统来调整。
- 在稀释任何 SYTO 染料时，应使用塑料管，因为稀释后的染料会粘附在玻璃上。
- 一般来说，要获得最佳结果，应使用不含磷酸盐的缓冲液，如 Hanks 平衡盐溶液（货号 14025092）。
- 制备其他溶液时，请注意塑料或玻璃器皿上残留的去垢剂也可能影响许多细胞或微生物的真实或表观染色，导致有无细胞的溶液中都会出现明亮的染色物质。用温和的去垢剂洗涤所有实验室器皿，然后用热自来水冲洗，最后用去离子水（货号 751-610）多次冲洗。

说明

在初始实验中，最好测试多个染料浓度（在整个建议染料浓度范围内），确定可获得最佳染色效果的浓度。注意，生长培养基、细胞密度、其他细胞类型的存在以及其他因素都可能影响染色。

染色的真核细胞通常表现为弥漫性细胞质染色和细胞核染色。经常观察到核内小体有特别强烈的染色。由于这些染料具有细胞通透性且在中性 pH 值下含有净正电荷，因此也可以染色线粒体。活酵母的染色主要是染色线粒体。

SYTO 59 染料

真核细胞和原核细胞的细胞核染色

简介

细胞通透性 Invitrogen™ SYTO™ 59 Red 荧光染料在与核酸结合后会显示明亮的红色荧光。在真核的死、活细胞中，SYTO 59 染料通常用于细胞质或线粒体以及细胞核染色。此外，SYTO 59 染料可染色大多数活细菌和破膜细菌。

试剂与耗材

- 处于生长期的细胞
- SYTO 59 Red 荧光核酸染料 (货号 S11341)
- EVOS 成像系统

方案

1. 在适当的培养基和容器中培养用于荧光显微镜观察的细胞。
2. 除去培养基。
3. 用不含磷酸盐的缓冲液洗涤细胞 1~3 次，从而除去培养基。
4. 在不含磷酸盐的缓冲液中稀释（稀释比例为 1:1,000）母液（5 μM），制成 SYTO 59 染色液。
5. 用足量的染色液覆盖细胞。
6. 避光孵育 30 min。
7. 除去染色液。
8. 用不含磷酸盐的缓冲液洗涤细胞 3 次。
9. 使用EVOS成像系统进行细胞成像。

SYTO 59 染料的光谱信息和储存条件

激发波长/发射波长	622/645 nm
标准滤光片	Cy®3.5
EVOS 光立方	Texas Red
储存条件	≤-20°C

重要说明

本方案可用于：

- 使用荧光显微镜观察核酸（细胞核）染色

本方案不可应用于：

- 流式细胞术

小贴士

- 在每次使用前，请先将试剂平衡至室温，然后短暂离心，使 DMSO 溶液聚集在试剂瓶底部。
- 测试多个染料浓度（在 100 nM~5 μM 范围内），确定最佳浓度。
- 一般来说，要获得最佳结果，应使用不含磷酸盐的缓冲液，如 Hanks 平衡盐溶液（货号 14025092）。
- 将所有核酸结合染料视为潜在的诱变剂并小心处理。

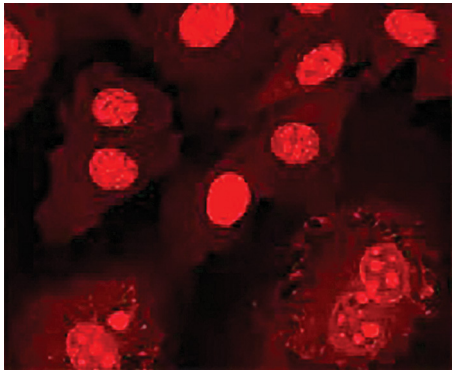
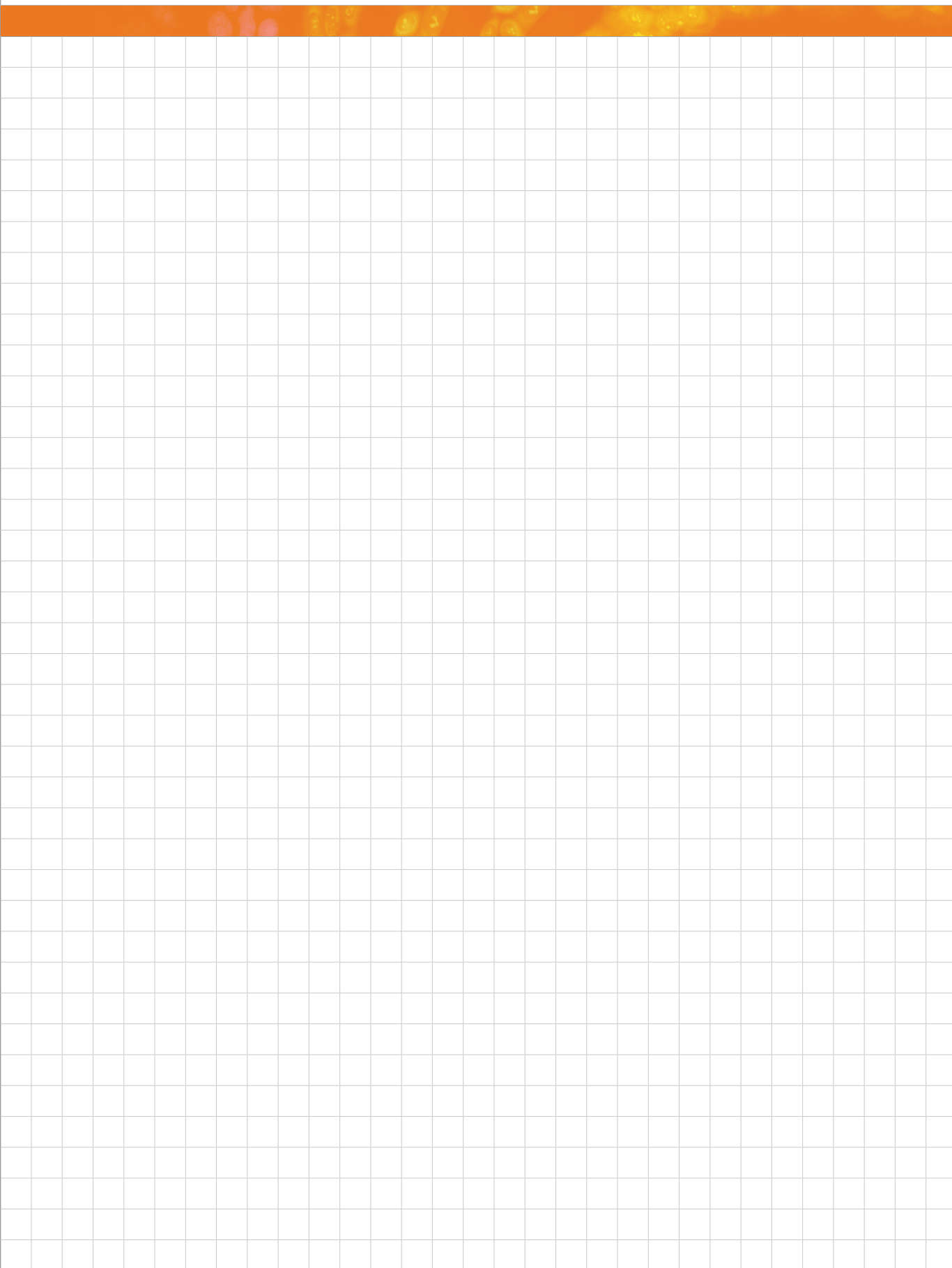


图 14.BPAEC 的细胞核染色。使用 SYTO 59 染料（5 μM，5 min）培养并染色牛肺动脉内皮细胞（BPAEC），然后成像。



细胞分析

活细胞成像



线粒体膜电位探针

四甲基罗丹明 (TMRM)

简介

健康的线粒体膜在细胞器内外维持着电位差，称为线粒体膜电位。Invitrogen™ 四甲基罗丹明甲酯 (TMRM) 是一种细胞渗透性染料，积聚在具有完整膜电位的活性线粒体中。如细胞健康且线粒体功能正常，则信号明亮。线粒体膜电位丧失后，TMRM 积聚停止，信号变暗或消失。

试剂与耗材

- Invitrogen™ Image-iT™ TMRM 试剂 (货号 I34361) 或四甲基罗丹明甲酯 (TMRM) (货号 T668)
- DMSO
- 细胞生长培养基
- 磷酸盐缓冲液 (PBS)

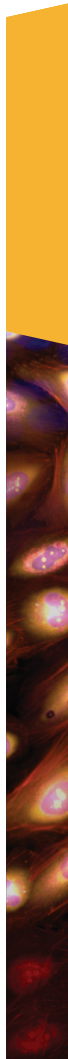
方案

制备母液

Image-iT™ TMRM 试剂 (货号 I34361) 以在 DMSO 中浓度为 100 μM 的 1,000X 浓缩母液形式提供。使用该试剂时，只需在细胞生长培养基或成像培养基中稀释 (稀释比例为 1:1,000) 母液。四甲基罗丹明甲酯 (TMRM) (货号 T668) 以 25 mg 冻干粉形式提供。用 5 mL DMSO 溶解整瓶 (25 mg) 冻干粉，制成 10 mM 母液。向 990 μL DMSO 中加入 10 μL 的 10 mM 溶液，制成 100 μM 母液。10 mM 母液和 100 μM 母液都可以在 -5°C 至 -30°C 冰箱中储存 6 个月。

制备染色液

100 μM TMRM 母液的浓度为 1,000X。向 10 mL 细胞生长培养基中加入 10 μL 的 100 μM 母液，制成浓度为 100 nM 的 1X 染色液。可以根据不同的用途和细胞类型，在 20 nM~250 nM 范围内调整浓度。制备并使用新鲜染色液，可获得最佳结果。



线粒体膜电位探针 (续)

四甲基罗丹明 (TMRM)

细胞染色方案

1. 培养细胞。
2. 除去细胞生长培养基。
3. 向细胞中加入染色液。
4. 在 37°C 下孵育 30 min。
5. 可选: 为了提高灵敏度, 用 PBS 或类似缓冲液洗涤。

说明

在荧光显微镜或高内涵成像分析中, 建议使用 TRITC/RFP 滤光片。

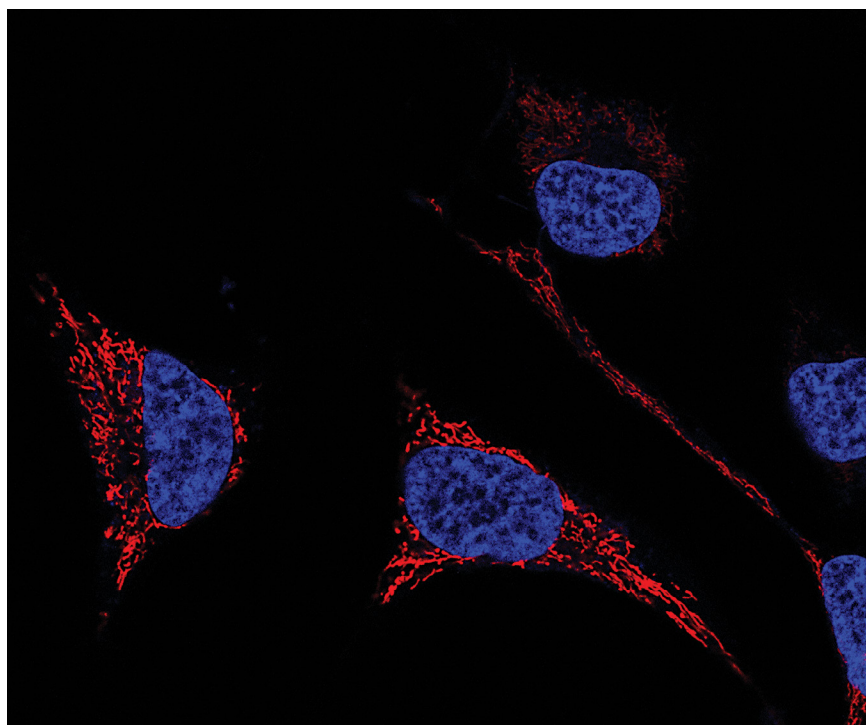


图 15. 使用 100 nM Image-iT TMRM (货号 I34361, 红色) 和 Hoechst 33342 染料 (货号 H3570, 蓝色) 染色 30 min 的 U2OS 细胞。

CellEvent Caspase-3/7 Green 检测试剂

活细胞成像

简介

Invitrogen™ CellEvent™ Caspase-3/7 Green 检测试剂是一种荧光底物，可用于检测活化的 Caspase-3/7。该试剂由与核酸结合染料偶联的四肽（DEVD）组成。由于 DEVD 肽抑制了染料与 DNA 结合的能力，因此这种细胞渗透性底物本身无荧光。当凋亡细胞中的 Caspase-3/7 活化后，DEVD 肽被裂解，在荧光显微镜或高内涵成像分析中，建议使用 TRITC/RFP 滤光片。

试剂与耗材

- CellEvent Caspase-3/7 Green 检测试剂 (货号 C10423, C10723)
- 细胞样品
- 胎牛血清
- DPBS (含钙和镁) (货号 14040133)
- 可选: 完全培养基 (作为 CellEvent Caspase-3/7 试剂的稀释剂)。
- 可选: 固定剂 (如用 PBS 配制的 3.7% 甲醛)
- 可选: ProLong™ Diamond 抗淬灭封片剂 (货号 P36970) 或 SlowFade™ Diamond 抗淬灭封片剂 (货号 S36972)

方案

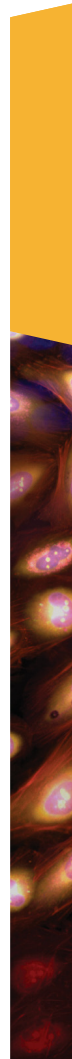
以下方案使用了 HeLa、U-2 OS 细胞以及优化浓度 (5 μ M) 的 CellEvent Caspase-3/7 Green 检测试剂，但适用于任何细胞类型。生长培养基、细胞密度、细胞类型差异以及其他因素都可能影响标记。在初始实验中，我们建议测试一系列浓度的 CellEvent Caspase-3/7 Green 检测试剂，以确定最佳实验条件。

检测选择

以下为凋亡终点检测的方案。然而，也可以通过使用 CellEvent Caspase-3/7 Green 检测试剂处理完全培养基中的细胞并延长孵育时间，来进行诱导凋亡的动力学或动态测量。

本方案在第 44 页继续

仅用于科学研究，不可用于临床诊断。



CellEvent Caspase-3/7 Green 检测试剂 (续)

终点检测

1. 按所需时长使用适当的凋亡诱导剂处理细胞。
2. 用含5% FBS 的 PBS (货号 14040133) 或完全培养基稀释 CellEvent Caspase-3/7 Green 检测试剂至终浓度为 2~8 μM 。
3. 可选: 此步骤可以使用细胞渗透性核染料染色细胞。
4. 除去细胞中的培养基, 然后向细胞中加入稀释的试剂 (在步骤 2 中制备)。例如, 如果在 96 孔板中染色细胞, 则向每孔中加入 100 μL 试剂溶液。
5. 在 37°C 下孵育细胞至少 30 min。
6. 可选: 此步骤可以使用甲醛类固定剂来保存细胞。建议使用 3.7% 甲醛固定 15 min, 但具体条件可以根据细胞类型来调整。
7. 可选: 如果尚未复染细胞, 则可以在此步骤使用细胞核染料或复染剂来染色细胞。
8. 可选: 为了稳定和延长信号寿命, 可使用 ProLong™ Diamond 抗淬灭封片剂 (货号 P36970) 来完成最终的过夜封片。如需快速封片, 可使用 SlowFade™ Diamond 抗淬灭封片剂 (货号 S36972)。
9. 使用适当的仪器滤光片组 (如用于 FITC 和 Alexa Fluor™ 488 染料的滤光片) 进行细胞成像分析。CellEvent Caspase-3/7 Green 检测试剂的激发波长/发射波长最大值为 502/530 nm。

说明

最好确定所选细胞类型的孵育时间; 对 HeLa 细胞, 30 min 就足够了。

动力学检测

1. 用完全培养基稀释 CellEvent Caspase-3/7 Green 检测试剂至终浓度为 2~10 μM 。注意: 在初始实验中, 我们建议测试 2~10 μM CellEvent Caspase-3/7 Green 检测试剂。最佳浓度可能因实验条件而异。
2. 制备凋亡诱导剂。
3. 向完全培养基中的细胞加入步骤1中用完全培养基制备的 CellEvent Caspase-3/7 Green 检测试剂。
4. 向用 CellEvent Caspase-3/7 Green 检测试剂处理过的细胞中加入凋亡诱导剂, 然后将细胞放回培养箱。
5. 在所需时间点, 取出培养箱中的细胞, 并使用 Invitrogen™ FITC/Alexa Fluor™ 488 滤光片设置来观察细胞凋亡的进程。

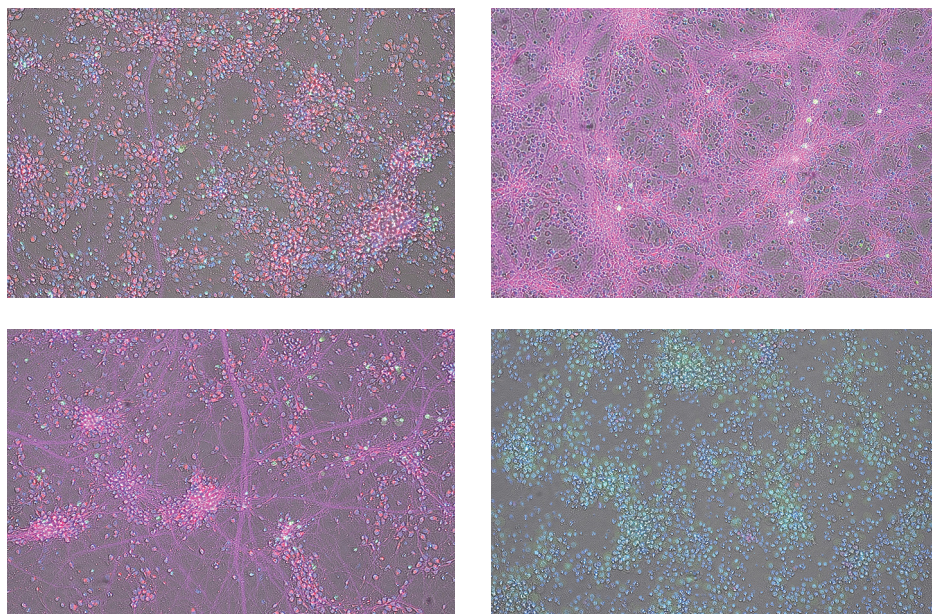


图 16. 在添加了 25 μM 谷氨酸和 1X Gibco™ GlutaMAX™ 添加剂的 Neurobasal Plus 和 B-27™ Plus 添加剂中培养了 14 DIV (体外培养天数) 的小鼠胚胎海马神经元。细胞用氯化镉以半对数间隔处理 18h 后, 使用 NucBlue 活细胞染料、CellEvent Green Caspase-3/7、Image-iT TMRM 和 Tubulin Tracker Deep Red 染色。使用 EVOS 成像系统采集图像。

CellROX 氧化应激试剂

简介

Invitrogen™ CellROX™ 氧化应激试剂是一种专门设计用于可靠地检测活细胞中的活性氧 (ROS) 的荧光探针。此细胞渗透性试剂在还原态下无荧光或荧光很弱，在氧化后显示出强烈的荧光信号。CellROX Green 试剂是一种 DNA 染料，氧化后会与 DNA 结合；因此，其荧光信号主要在细胞核和线粒体中。相反，CellROX Deep Red 试剂和 CellROX Orange 试剂的荧光信号主要在细胞质中。CellROX 氧化应激试剂产生的荧光可以使用荧光显微镜、高内涵成像分析仪、微孔板荧光分析或流式细胞仪来检测。

试剂与耗材

- CellROX 氧化应激试剂 (货号 C10422、C10443、C10444、C10448)
- 细胞和培养基
- 磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.2~7.6)
- 可选: 固定剂 (即用 PBS 配制的 3.7% 甲醛)
- 可选: 破膜剂 (即 0.5% Triton X-100)。

方案

1. 使用待测化合物或药物处理细胞。
2. 加入终浓度为 5 μ M 的 CellROX 试剂。
3. 在 37°C 下孵育细胞 30 min。
4. 除去培养基, 用 PBS 洗涤细胞 3 次。
5. 可选: 如果使用 CellROX Deep Red 试剂或 CellROX Green 试剂, 则可以用 3.7% 甲醛固定细胞 15 min。
6. 可选: 此步骤可以使用 NucBlue™ 活细胞染料 (细胞核复染剂) 或其他复染剂来染色细胞。
7. 可选: 当使用 CellROX Green 试剂时, 如果还需使用其他试剂进行多通道检测, 则可以用 0.5% Triton X-100 破膜细胞 10 min。
8. 分析细胞。

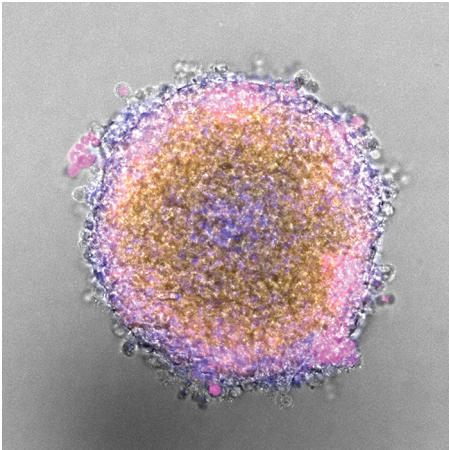


图 17.在 Nunclon Sphera (货号 174925) 微孔板中生长并使用 NucBlue 活细胞染料 (货号 R37605)、MitoTracker Orange CMTMRos (货号 M7510) 和 CellROX Deep Red试剂 (货号 C10422) 标记的 A549 球状体。使用 EVOS 成像系统采集的图像。

简介

Invitrogen™ CellTracker™ 荧光探针是监测细胞运动、定位、增殖、迁移、趋化和侵袭的绝佳工具。CellTracker 荧光探针经过专门设计，可以自由穿过细胞膜；然而，一旦进入细胞，该荧光探针就会转化为细胞非渗透性反应产物。转化为非渗透性物质后，CellTracker 荧光探针可以在活细胞中很好地保留数代。探针会转移到子代细胞，但不会转移到细胞群中的相邻细胞。内含 CellTracker 荧光探针的细胞至少会显示荧光 72 h，表现出了理想的示踪染料特性，即稳定，在工作浓度下无毒，在细胞中保留良好，并在生理 pH 值下荧光明亮。此外，我们还提供多种具有不同激发和发射光谱的 CellTracker 荧光探针，支持进行多通道检测。

试剂与耗材

- CellTracker 染料（见第 49 页“EVOS 显微镜”下的表格）
- 无水二甲基亚砜（DMSO）
- 磷酸盐缓冲液（PBS）

方案

制备细胞

在适当的培养基中培养细胞。可在装有培养基的培养皿内的盖玻片上培养贴壁细胞。

实验方案

以下方案描述了将试剂加入培养的细胞中，并使用 EVOS 荧光显微镜来成像已染色的细胞的实验过程。

探针的最佳染色浓度因用途而异。在初始实验中，我们建议测试至少 10 倍的浓度范围。一般来说，长期染色（超过约 3 天）或用于快速分裂的细胞需要 5~25 μM 染料。而短期实验（如活力检测）只需要较少的染料（0.5~5 μM ）。由于使用 CellTracker™ Deep Red 染料染色会产生高荧光信号，因此该染料的最佳浓度范围为 250 nM~1 μM 。为了维持细胞正常生理功能并减少潜在假阳/阴性，应将染料浓度保持在尽可能低的水平。

重要说明

避免使用含胺和含硫醇的缓冲液。

说明

如需了解 CellTracker™ 试剂的分子量，请参阅第 49 页“EVOS 显微镜”下的表格。

CellTracker

荧光探针 (续)

制备染料工作溶液

开盖前请先将试剂平衡至室温。用高质量 DMSO 溶解该冻干染料，制成终浓度为 10 mM 的溶液。例如，在每瓶 CellTracker™ Deep Red 染料中加入 20 μ L DMSO，制成 1 mM (1,000X) 溶液。用无血清培养基稀释该母液至 0.5~25 μ M 终浓度。将该工作溶液加热至 37° C。

悬浮细胞的染色方案

1. 离心，弃去上清并收集沉淀的细胞。在预热的 CellTracker 染料工作溶液中轻柔地重悬细胞 (见“制备染料工作溶液”)。
2. 在适合该细胞类型的生长条件下孵育细胞 15~45 min。
3. 离心细胞并除去上清液。
4. 加入所选培养基，并将已标记的细胞悬液铺至所选载玻片上或培养容器中。
5. 使用适合 CellTracker™ 探针的发射和激发滤光片成像 (见第 49 页表格)。

贴壁细胞的染色方案

1. 除去培养基。
2. 缓缓加入预热的 CellTracker 染料工作溶液 (见上述“制备染料工作溶液”)。
3. 在适合该细胞类型的生长条件下孵育细胞 15~45 min。
4. 除去溶液。

5. 加入所选培养基。

6. 使用适合 CellTracker™ 探针的发射和激发滤光片成像 (见下表)。

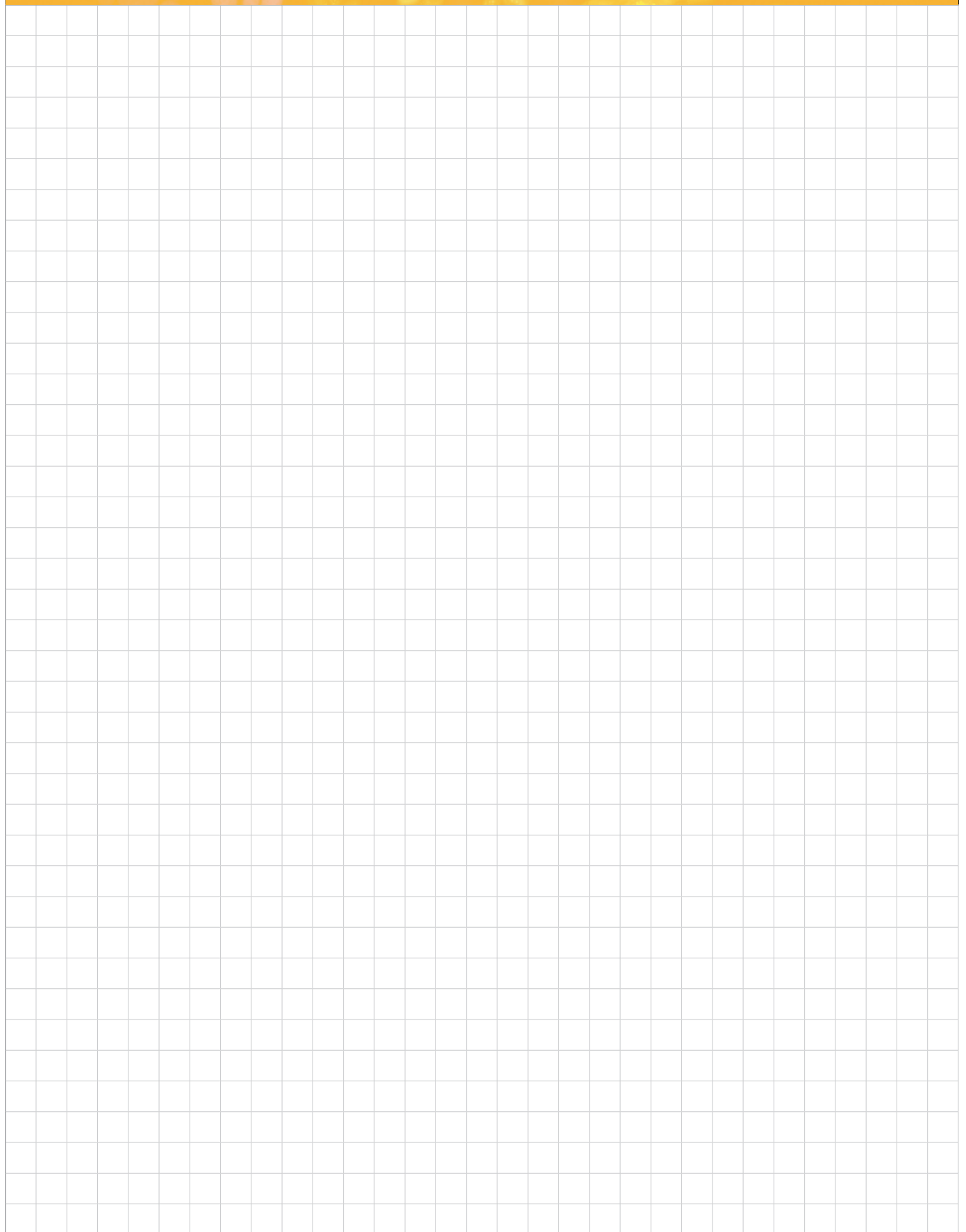
EVOS 智能细胞荧光成像分析系统

CellTracker™ 探针可用于多种具有标准光学和视频增强功能的落射荧光显微镜，如 EVOS 细胞成像系统可以实现活细胞培养和实时成像监测的功能。根据染料选择滤光片。下表总结了 CellTracker™ 探针的光谱特征。

货号	CellTracker™ 探针	分子量	激发波长 (nm) ¹	发射波长 (nm) ¹
C2110	CellTracker™ Blue CMAC 染料 (7-氨基-4-氯甲基香豆素)	209.6	353	466
C12881	CellTracker™ Blue CMF2HC 染料 (4-氯甲基-6,8-二氟-7-羟基香豆素)	246.6	371	464
C2111	CellTracker™ Blue CMHC 染料 (4-氯甲基-7-羟基香豆素)	210.6	372	470
C10094	CellTracker™ Violet BMQC 染料 (2,3,6,7-四氢-9-溴甲基-1H,5H-喹啉并(9,1-g)香豆素)	334.2	415	516
C2925, C7025	CellTracker™ Green CMFDA 染料 (5-氯甲基荧光素二乙酸酯)	464.9	492 ²	517 ²
C2102	CellTracker™ Green BODIPY™ 染料 (8-氯甲基-4,4-二氟-1,3,5,7-四甲基-4-硼杂-3a,4a-二氮杂对称引达省)	296.6	522	529
C2927	CellTracker™ Orange CMTMR 染料 (5-(和-6)-(((4-氯甲基)苯甲酰基)胺基)四甲基罗达明)	554.0	541	565
C34551	CellTracker™ Orange CMRA 染料	550.4	548	576
C34552	CellTracker™ Red CMTPX 染料	686.3	577	602
C34565	CellTracker™ Deep Red 染料	698.3	630	660

¹ 吸收和荧光发射最大值，在水性缓冲液或甲醇中测定；数值在细胞环境中可能有所不同

² 在乙酸酯基团被细胞内酯酶裂解前，CMFDA 无色且无荧光；乙酸酯水解产生具有所述光谱特征的产物。MW = 分子量



细胞分析

免疫标记



甲醛固定和破膜细胞的ICC染色

直标一抗检测

简介

免疫标记或免疫细胞化学（ICC）是一种使用抗体来荧光标记样品中的特异性生物靶标的技术。下述为使用一抗（已使用荧光染料直接标记）来免疫标记甲醛固定和破膜的细胞的一般方案。使用直标一抗进行的免疫标记可用于高丰度靶标，无需使用二抗检测法进行信号放大。

试剂与耗材

- 磷酸盐缓冲液 (PBS)
- 固定剂, 如用 PBS 配制的 4% 甲醛
- 破膜剂, 如用 PBS 配制的 0.2% Triton X-100
- 可选: Image-iT FX 信号增强剂 (货号 I36933)
- 封闭剂, 如 PBS 稀释的 3~6% 牛血清白蛋白 (BSA) 或 5% 普通山羊血清, 或 BlockAid 封闭剂 (货号 B10710)
- 直标一抗。我们提供靶点全面的高质量抗体, 请访问 thermofisher.cn/antibodies 了解详情
- 可选: 复染剂, 如 DAPI (货号 D1306)
- 封片剂, 如 Invitrogen™ ProLong™ Glass 抗淬灭封片剂 (货号 P36980)

方案

不同物种的一抗或标记偶联的一抗可以混合在一种溶液中。某些一抗可能需要抗原修复。除非另有说明, 所有步骤均在室温下进行。

1. 除去培养基并固定细胞 (常用固定剂为用 PBS 配制的 4% 甲醛; 固定时长为 15 min)。
2. 用 PBS 充分洗涤细胞 (常规操作为 3 次, 每次 5 min)。
3. 破膜细胞至少 30 min (常用破膜剂为用 PBS 配制的 0.2% Triton X-100 溶液)。

说明



Invitrogen 可提供经过严格两步法验证的高级验证抗体, 包括靶点特异性确认和功能应用验证, 更能保障您的实验结果。靶标特异性确认方法包括:

- 免疫沉淀-质谱联用
- 敲除/敲低
- 独立抗体实验
- 细胞处理
- 相对表达等

更多详情请查看“Invitrogen抗体验证技术”。

甲醛固定和破膜细胞的ICC染色(续)

直标一抗检测

4. 用 PBS 充分洗涤细胞 (常规操作为 3 次, 每次 10 min)。

5. 可选: 使用 Image-iT FX 信号增强剂 (货号 I36933) 封闭非特异性染料结合。

6. 封闭至少 60 min, 以避免非特异性抗体结合, 常用封闭剂为 PBS 配置的 3~6% BSA 或 5% 普通山羊血清, 或 BlockAid 封闭剂 (货号 B10710) 等成品封闭剂。

7. 在用封闭剂稀释的一抗中孵育至少 30 min (抗体浓度各不相同, 但通常为 0.5~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。

8. 用 PBS 充分洗涤细胞 3 次, 每次 10 min。

9. 根据需要复染细胞, 如使用 DAPI (货号 D1306)。

10. 在适当的封片剂中封片; 对于荧光一抗, 最好使用高质量抗淬灭封片剂, 如 ProLong Glass 抗淬灭封片剂 (货号 P36980)。

甲醛固定和破膜细胞的ICC染色

二抗间接检测

简介

免疫标记或免疫细胞化学（ICC）是一种使用抗体来荧光标记样品中的特异性生物靶标的技术。下述为使用无标记一抗和荧光染料标记的二抗来免疫检测甲醛固定和破膜细胞的一般方案。由于多个二抗分子可与一抗结合，使用一抗和二抗完成的间接免疫标记可产生信号放大。

试剂与耗材

- 磷酸盐缓冲液 (PBS)
- 固定剂, 如用 PBS 配制的 4% 甲醛
- 破膜剂, 如用 PBS 配制的 0.2% Triton X-100
- 可选: Invitrogen™ Image-iT™ FX 信号增强剂 (货号 I36933)
- 封闭剂, 如 PBS 配置的 3~6% 牛血清白蛋白 (BSA) 或 5% 普通山羊血清, 或 BlockAid 封闭剂 (货号 B10710)
- 一抗和二抗。我们提供广泛的高质量抗体产品, 请访问 thermofisher.cn/antibodies 了解详情
- 可选: 复染剂, 如 DAPI (货号 D1306)
- 封片剂, 如 Invitrogen™ ProLong™ Glass 抗淬灭封片剂 (货号 P36980)

说明

查看Alexa Fluor 系列等全部荧光二抗, 请访问“Invitrogen二抗主页”。

方案

如需标记贴壁细胞, 可以将贴壁细胞浸入微孔板各孔的染色液中, 倒置在 Parafilm™ 封口膜上的标记溶液上, 或者可以将染色液或标记溶液滴在湿室中的盖玻片上。悬浮细胞可以在试管中标记, 在洗涤和染色步骤之间离心沉淀。不同物种的一抗或标记偶联的一抗可以混合在一种溶液中。识别不同物种或同型一抗的二抗可以混合在一种溶液中。所有步骤均在室温下完成。

甲醛固定和破膜细胞的ICC染色(续)

二抗间接检测

1. 除去培养基并固定细胞(常用固定剂为用 PBS 配制的 4% 甲醛;固定时长为 15 min)。
2. 用 PBS 充分洗涤细胞(常规操作为 3 次,每次 5 min)。
3. 破膜细胞 30 min; 常用破膜剂为用 PBS 配制的 0.2% Triton X-100 溶液。
4. 用 PBS 充分洗涤细胞。
5. 可选: 使用 Image-iT FX 信号增强剂(货号 I36933)封闭非特异性染料结合。
6. 封闭30~60 min以避免非特异性抗体结合, 常用封闭剂为 PBS 配置的 3~6% BSA 或 5% 普通山羊血清, 或 BlockAid 封闭剂(货号 B10710)等成品封闭剂。
7. 在封闭剂稀释的一抗中孵育 30~60 min(抗体浓度各不相同, 但通常为 0.5~10 $\mu\text{g/mL}$)。
8. 用 PBS 充分洗涤细胞。
9. 在3~6% 牛血清白蛋白(PBS 配置)稀释的二抗中孵育 30~60 min(较佳初始抗体浓度为 5 $\mu\text{g/mL}$)。
10. 用 PBS 充分洗涤细胞。
11. 根据需要复染细胞, 如使用 DAPI(货号 D1306)。
12. 在适当的封片剂中封片; 对于荧光二抗, 最好使用高质量抗淬灭封片剂, 如 ProLong Glass 抗淬灭封片剂(货号 P36980)。

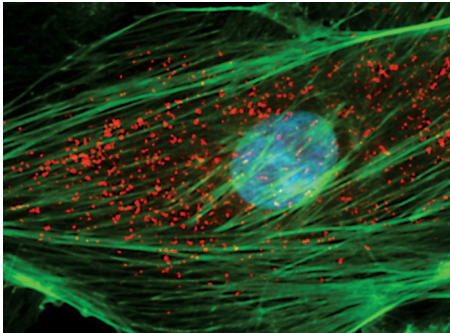


图 18.固定 BPAE 细胞中肌动蛋白(绿色)、细胞核(蓝色)和过氧化物酶体(红色)的三色成像。使用 Image-iT 固定/破膜试剂盒(货号 R37602)固定、破膜和封闭 BPAE 细胞。使用兔源 PMP70 抗体标记过氧化物酶体, 然后用 Alexa Fluor 594 山羊抗兔 IgG 二抗(ReadyProbes 试剂, 货号 R37117)来检测。使用 ActinGreen 488 ReadyProbes 试剂(货号 R37110)染色肌动蛋白; 使用 NucBlue 固定细胞 ReadyProbes 试剂(货号 R37606)复染细胞核。

ICC 生物素/链霉亲和素信号放大

针对培养细胞的通用实验方案: 链霉亲和素

简介

以提高检测灵敏度，基于链霉亲和素的信号放大技术广泛应用于荧光成像，用来检测生物素化的生物分子，如一抗和二抗。基于链霉亲和素的检测适用于中低丰度靶标的信号放大，工作流程简单有效。下列方案是在固定细胞上进行生物素 / 链霉亲和素信号放大的通用说明。

试剂与耗材

- 磷酸盐缓冲液 (PBS)
- 固定剂 (如用 PBS 配制的 4% 甲醛)
- 破膜液 (如用 PBS 配制的 0.2% Triton X-100)
- 内源性生物素封闭试剂盒 (货号 E21390)
- 可选: Image-iT FX 信号增强剂 (货号 I36933)
- 封闭液, 如 PBS 稀释的 3~6% 牛血清白蛋白 (BSA) 或 5% 普通山羊血清, 或 BlockAid 封闭剂 (货号 B10710)
- 生物素化的一抗或二抗
- 带标记的链霉亲和素试剂
- 可选: 复染剂 (如 DAPI (货号 D1306))
- 封片剂 (如 ProLong Glass 抗淬灭封片剂 (货号 P36980))

方案

如需标记贴壁细胞，可以将细胞浸入装有染色溶液的孔板中、倒置到 Parafilm 封口膜上的标记溶液中，或者将染色溶液或标记溶液加到湿箱中的盖玻片上。悬浮细胞可以在离心管中标记，在多个洗涤步骤和染色步骤之间进行离心。所有步骤通常在室温下进行。

1. 除去培养基并固定细胞 (常见固定剂为用 PBS 配制的 4% 甲醛, 固定时长为 15 min)。
2. 用 PBS 洗涤细胞, 一般洗3 次, 每次 5 min。

本方案在第 56 页继续

ICC 生物素/链霉亲和素信号放大(续)

针对培养细胞的通用实验方案: 链霉亲和素

3. 破膜 30 min (常用破膜剂为用 PBS 配制的 0.2% Triton X-100 溶液)。

4. 用 PBS 洗涤细胞。

5. 使用内源性生物素封闭试剂盒来封闭内源性生物素 (试剂盒货号 E21390, 方案包括两个约 20 min 的封闭步骤, 外加洗涤步骤)。

6. 可选: 使用 Image-iT FX 信号增强剂 (货号 I36933) 减少非特异性的染料结合。

7. 封闭30~60 min, 以减少非特异性的抗体结合常用封闭剂为 PBS 稀释的 3~6% BSA 和 5% 普通山羊血清, 或 BlockAid 封闭剂 (货号 B10710) 等成品封闭剂。

8. 一抗孵育 30~60 min (用封闭剂稀释一抗; 抗体浓度各不相同, 但通常为 0.5~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。

9. 用 PBS 洗涤细胞。

10. 如果一抗尚未生物素化, 在生物素化的二抗中孵育 30~60 min (用PBS 配置的 3~6% BSA稀释二抗, 适当的初始抗体浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。

11. 用 PBS 洗涤细胞。

12. 使用链霉亲和素偶联物标记 30 min (用PBS 配置的 3~6% BSA稀释, 浓度为 2~5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。

13. 用 PBS 洗涤细胞。

14. 按需复染, 如 DAPI (货号 D1306))。

15. 在适当的封片剂中封片。针对荧光链霉亲和素, 最好使用高质量抗淬灭封片剂, 如 ProLong Glass 抗淬灭封片剂 (货号 P36980)。

石蜡组织切片间接 IHC

针对固定石蜡组织切片的通用实验标记方案

简介

免疫标记或免疫组织化学（IHC）是一种使用抗体来荧光标记样品中的特异性生物靶标的技术。该方案提供了使用无标记的一抗和荧光染料标记的二抗来免疫标记固定石蜡组织切片的通用说明。多个二抗分子可以与单个一抗分子结合，因此使用一抗和二抗进行间接免疫标记可实现信号放大。

试剂与耗材

- 脱蜡剂, 如 Histo-Clear或其他柠檬酸溶剂
- 乙醇
- 磷酸盐缓冲液 (PBS)
- 固定剂, 如用 PBS 配制的 4% 甲醛
- 破膜剂, 如用 PBS 配制的 0.2% Triton X-100
- 可选: ReadyProbes 组织自体荧光淬灭试剂盒
- PBT, 含 0.1% Triton X-100 和 0.1% 牛血清白蛋白 (BSA) 的磷酸盐缓冲液 (PBS)
- 可选: Image-iT FX 信号增强剂 (货号 I36933)
- 封闭剂, 如PBS配置的 3~6% BSA 或 5% 普通山羊血清, 或 BlockAid 封闭剂 (货号 B10710)
- 一抗和二抗。我们提供的靶点齐全的高质量抗体, 请访问 thermofisher.cn/antibodies 了解详情
- 可选: 复染剂, 如 DAPI (货号 D1306)
- 封片剂, 如 ProLong Glass 抗淬灭封片剂 (货号 P36980)

方案

1. 在溶剂中脱蜡。脱蜡剂或其他柠檬酸溶剂比二甲苯产生的自体荧光更少。
2. 在梯度乙醇中水化, 再放回 PBS 中洗涤。

方案指南

- 非常厚的切片可能需要更长的洗涤时间和孵育时间。
- 组织切片 (尤其是石蜡组织切片) 可能存在自体荧光问题, 会降低抗原检测的信背比。
- 不同物种的一抗或一抗偶联物可以在一种溶液中混合。识别不同物种或同型一抗的二抗可以在一种溶液中混合。
- 某些一抗可能需要抗原修复。
- 除非另有说明, 否则所有步骤通常在室温下进行。

石蜡组织切片间接 IHC (续)

针对固定石蜡组织切片的通用实验方案

- 破膜处理组织切片至少 30 min (常用破膜剂为用 PBS 配制的 0.2% Triton X-100 溶液)。
- 可选: 使用 ReadyProbes 组织自体荧光淬灭试剂盒减少自体荧光。
- 用 PBT 充分洗涤 3 次, 每次 10 min。
- 可选: 按需进行抗原修复; 并非所有一抗都需要抗原修复, 而且抗原修复可以增加自体荧光。
- 用 PBT 充分洗涤 (一般洗 3 次, 每次 10 min)。
- 可选: 使用 Image-iT FX 信号增强剂 (货号 I36933) 减少非特异性的染料结合。
- 封闭至少 60 min, 以减少非特异性抗体结合。常用封闭剂为 PBS 配置的 3~6% BSA 或 5% 普通山羊血清, 或 BlockAid 封闭剂 (货号 B10710) 等成品封闭剂。
- 一抗孵育至少 2 h (一抗用封闭剂稀释, 抗体浓度各异, 但通常为 0.5~10 $\mu\text{g/mL}$)。在 4°C 下一抗孵育过夜是最常用的方法。
- 用 PBT 充分洗涤细胞。
- 二抗孵育至少 2 h (用 PBS 配置的 3~6% BSA 稀释二抗; 可以 5 $\mu\text{g/mL}$ 为起点调整二抗浓度)。
- 用 PBS 充分洗涤细胞。
- 按需复染, 如使用 DAPI (货号 D1306)。
- 用合适的封片剂封片, 针对荧光二抗, 最好使用高质量抗淬灭封片剂, 如 ProLong Glass 抗淬灭封片剂 (货号 P36980)。

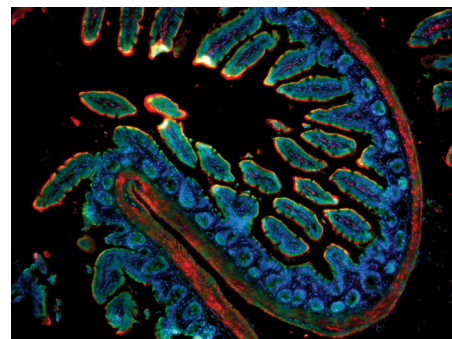


图 19.使用 NucBlue 活细胞染料和山羊抗兔 Alexa Fluor Plus 555 二抗 (用于检测兔泛肌动蛋白一抗) 标记的小鼠回肠 8 μm FFPE 切片。使用 EVOS M7000 智能活细胞成像系统成像。

说明

Alexa Fluor Plus 荧光二抗是 Invitrogen 独家提供的产品, 信噪比更优越, 适用于珍贵样本的中低丰度检测。

了解更多, 请访问“Alexa Fluor Plus 二抗主页”。

组织冰冻切片间接IHC

针对固定组织切片的通用实验方案

简介

免疫标记或免疫组织化学 (IHC) 是一种使用抗体来荧光标记样品中的特异性生物靶标的技术。该方案提供了使用无标记的一抗和荧光标记的二抗来免疫标记组织冰冻切片的通用说明。多个二抗分子可以与单个一抗分子结合, 因此使用一抗和二抗进行间接免疫标记可实现信号放大。

试剂与耗材

- 磷酸盐缓冲液 (PBS)
- 破膜剂 (如用 PBS 配制的 0.2% Triton X-100)
- PBT, 含 0.1% Triton X-100 和 0.1% 牛血清白蛋白 (BSA) 的磷酸盐缓冲液 (PBS)
- 可选: Image-iT FX 信号增强剂 (货号 I36933)
- 封闭剂, 如PBS配置的 3~6% BSA 或 5% 普通山羊血清, 或 BlockAid封闭剂 (货号 B10710)
- 我们提供靶点齐全的高质量抗体, 请访问 thermofisher.cn/antibodies 了解详情
- 可选: 复染剂, 如 DAPI (货号 D1306)
- 封片剂, 如 ProLong Glass 抗淬灭封片剂 (货号 P36980)

方案

1. 破膜处理组织切片至少 30 min (常用破膜剂为用 PBS 配制的 0.2% Triton X-100 溶液)。
2. 用 PBT 充分洗涤, 一般洗 3 次, 每次 10 min。
3. 可选: 使用 Image-iT FX 信号增强剂 (货号 I36933) 减少非特异性的染料结合。
4. 封闭至少 60 min, 以减少非特异性的抗体结合, 常用封闭剂为PBS配置的 3~6% BSA 或 5% 普通山羊血清, 或BlockAid 封闭剂 (货号 B10710) 等成品封闭剂。

方案指南

- 要标记冰冻切片, 可在载玻片上漂片或封片, 并应在步骤 1 前, 在 PBS 中完成水化。
- 非常厚的切片可能需要更长的洗涤时间和孵育时间。组织切片 (尤其是石蜡组织切片) 可能存在自体荧光问题, 可能会降低抗原检测的信背比。
- 不同物种的一抗或标记偶联的一抗可以在一种溶液中混合。识别不同物种或同型一抗的二抗可以在一种溶液中混合。
- 某些一抗可能需要抗原修复。
- 除非另有说明, 所有步骤通常在室温下完成。

组织冰冻切片间接IHC (续)

针对固定组织切片的通用实验方案

5. 一抗孵育至少 2 h (封闭剂中稀释一抗, 抗体浓度各异, 但通常为 0.5~10 $\mu\text{g/mL}$)。在 4°C 下一抗孵育过夜是最常用的方法。
6. 用 PBT 充分洗涤细胞。
7. 在二抗中孵育至少 2 h (在 3~6% BSA /PBS 中, 可以 5 $\mu\text{g/mL}$ 为起点调整二抗浓度)。
8. 用 PBS 充分洗涤细胞。
9. 按需复染, 如使用 DAPI (货号 D1306)。
10. 在适当的封片剂中封片, 针对荧光二抗, 最好使用高质量抗淬灭封片剂, 如 ProLong Glass 抗淬灭封片剂 (货号 P36980)。



图 20. 人小脑冻存组织切片染色结果图。标记组织使用的试剂和抗体包括: NucBlue 固定细胞 ReadyProbes 试剂 (货号: R37606)、小鼠抗 β -微管蛋白抗体 (货号: 32-2600)、Alexa Fluor Plus 488 山羊抗小鼠二抗 (货号: A32723)、Alexa Fluor Plus 555 鬼笔环肽 (货号 A30106)、兔抗 GFAP 抗体、Alexa Fluor Plus 647 山羊抗兔二抗 (货号 32733)。

用 ProLong Glass 抗淬灭封片剂 (货号 P36980) 进行封片, 并使用 EVOS M7000 智能活细胞成像分析系统采集图像 (货号 AMF7000; 配备 DAPI (货号 AMEP4950)、GFP (货号 AMEP4951)、RFP (货号 AMEP4952) 和 Cy5 (货号 AMEP4956) EVOS 光立方)。该图像由 272 个单独的视野拼接而成。

固定组织 IHC

生物素/链霉亲和素信号放大

针对固定组织切片的通用实验方案: 链霉亲和素

简介

以提高检测灵敏度，基于链霉亲和素的信号放大技术广泛应用于荧光成像，用来检测生物素化的生物分子，如一抗和二抗。基于链霉亲和素的检测适用于中低丰度靶标的信号放大，工作流程简单有效。下列方案是在固定组织切片上进行生物素/链霉亲和素信号放大的通用说明。

试剂与耗材

- 磷酸盐缓冲液 (PBS)
- 破膜剂 (如用 PBS 配制的 0.2% Triton X-100)
- PBT, 含 0.1% Triton X-100 和 0.1% 牛血清白蛋白 (BSA) 的磷酸盐缓冲液 (PBS)
- 可选: Image-iT FX 信号增强剂 (货号 I36933)
- 封闭剂, 如 PBS 配置的 3~6% BSA 或 5% 普通山羊血清 或 BlockAid 封闭剂 (货号 B10710)
- 我们提供靶点齐全的高质量生物素化抗体, 请访问 thermofisher.cn/antibodies 了解详情
- 带标记的链霉亲和素
- 可选: 复染剂, 如 DAPI (货号 D1306)
- 封片剂, 如 ProLong Glass 抗淬灭封片剂 (货号 P36980)

方案

1. 破膜处理组织切片至少 30 min (常用破膜剂为用 PBS 配制的 0.2% Triton X-100 溶液)。
2. 用 PBT 充分洗涤, 一般洗 3 次, 每次 10 min。
3. 可选: 使用 Image-iT FX 信号增强剂 (货号 I36933) 减少非特异性的染料结合。

方案指南

- 如需标记冰冻切片, 可在载玻片上漂片或封片, 并应在步骤 1 前, 在 PBS 中完成水化。如需标记石蜡切片, 可以在载玻片上封片, 然后在二甲苯或成品柠檬酸溶剂中脱蜡, 并应在步骤 1 前, 在梯度乙醇中完成水化, 再在缓冲液中洗涤。
- 非常厚的切片可能需要更长的洗涤时间和孵育时间。组织切片 (尤其是石蜡组织切片) 可能存在自体荧光问题, 可能会降低抗原检测的信背比。
- 不同物种的一抗或标记偶联的一抗可以在一种溶液中混合。识别不同物种或同型一抗的二抗可以在一种溶液中混合。
- 某些一抗可能需要抗原修复。
- 除非另有说明, 否则所有步骤通常在室温下完成。

固定组织 IHC

生物素/链霉亲和素信号放大(续)

针对固定组织切片的通用实验方案: 链霉亲和素

4. 封闭至少 60 min, 以减少非特异性的抗体结合, 常用封闭剂为 PBS 配置的 3~6% BSA 或 5% 普通山羊血清, 或 BlockAid 封闭剂 (货号 B10710) 等成品封闭剂。

5. 一抗孵育至少 2 h (用封闭剂稀释一抗, 抗体浓度各不相同, 但通常为 0.5~10 µg/mL)。在 4°C 下一抗孵育过夜是最常用的方法。

6. 用 PBT 充分洗涤细胞。

7. 如果一抗已生物素化, 则可以跳过步骤 7 和步骤 8。在生物素化的二抗中孵育至少 2 h (用 PBT 配置的 3~6% BSA 稀释二抗, 可以 5 µg/mL 为起点调整二抗浓度)。

8. 用 PBT 充分洗涤细胞。

9. 使用链霉亲和素偶联物标记 1~2 h (用 PBT 配置的 3~6% BSA 稀释, 浓度为 2~5 µg/mL)。

10. 用 PBS 充分洗涤细胞。

11. 按需复染, 如使用 DAPI (货号 D1306)。

12. 在适当的封片剂中封片, 针对荧光链霉亲和素, 最好使用高质量抗淬灭封片剂, 如 ProLong Glass 抗淬灭封片剂 (货号 P36980)。

ICC 和 IHC 酪胺信号放大

酪胺 SuperBoost 试剂盒

简介

Invitrogen™ 酪胺 SuperBoost™ 信号放大试剂是一种高灵敏度方法，用于检测多通道荧光 ICC/IHC/ISH 实验中的低丰度靶标。酪胺 SuperBoost 技术结合了 Invitrogen™ Alexa Fluor™ 染料的亮度与多聚 HRP 介导的酪胺信号放大，从而可区分信号和背景。该技术的精确度和灵敏度是标准 ICC/IHC/ISH 的 10~200 倍，是其他酪胺扩增技术（如 TSA™）的 2~10 倍。Invitrogen™ 酪胺 SuperBoost™ 试剂盒中所用的酪胺信号放大利用辣根过氧化物酶（HRP）的催化活力来原位高密度标记靶蛋白或核酸序列。使用酪胺 SuperBoost 试剂盒的经典 ICC/IHC/ISH 实验流程需要的一抗比标准 ICC/IHC/ISH 实验节约 10~100 倍，并可达到相同的信号强度。酪胺 SuperBoost 试剂盒可提供远高于背景的特异性信号强度，因此可以轻松优化检测，可轻松观察到高内源性自体荧光的样品中检测特异性信号。

酪胺 SuperBoost 试剂盒简单易用，可根据标准 ICC、IHC 或 FISH 实验方案灵活调整，适用于任何类型的细胞或组织。使用酪胺 SuperBoost 试剂盒标记的细胞可以使用任何类型的显微镜进行成像分析，均可产出高分辨率的多通道图像。在组织样品中，可以使用同一宿主种属来源的一抗轻松完成多通道检测。

试剂与耗材

- 内含 Alexa Fluor™ 酪胺的酪胺 SuperBoost 试剂盒；如需了解选择指南，请访问 thermofisher.cn/tyramide
- 细胞或组织；根据需要使用阳性对照和阴性对照
- 载玻片、盖玻片和容器
- 一抗或二抗，根据需要而定。我们提供经严格验证的高质量 Invitrogen™ 抗体组合，请访问 thermofisher.cn/antibodies 了解详情
- Gibco™ PBS（磷酸盐缓冲液；pH = 7.4，不含钙、镁或酚红）（货号 10010031）
- 95% 乙醇
- Gibco™ 蒸馏水（高纯度）（货号 15230-147）
- Invitrogen™ ReadyProbes™ 疏水屏障免疫组化笔
- Invitrogen™ Image-iT™ 固定/破膜试剂盒（货号 R37602）

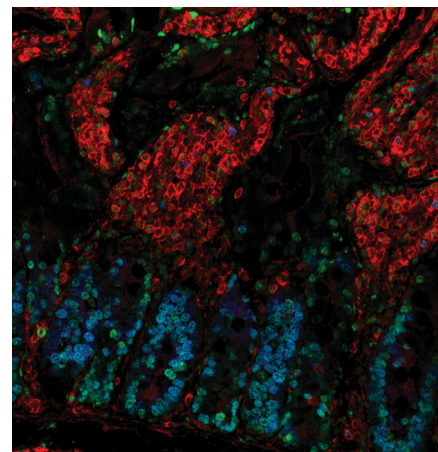


图 21. 使用酪胺 SuperBoost 试剂盒依次标记和检测三种不同的兔一抗。使用三种不同的兔一抗（抗 H2B、抗肌动蛋白和抗 Ki-67）依次标记经过福尔马林固定，石蜡包埋（FFPE）的大鼠肠切片。使用三种不同的 Invitrogen Alexa Fluor 酪胺 SuperBoost 试剂盒检测一抗。简而言之，在柠檬酸盐缓冲液（pH = 6）中热诱导抗原修复（在高压锅中高档位加热 10 min）组织样品，然后依次使用兔抗 H2B 抗体（使用 Alexa Fluor 647 酪胺 SuperBoost 试剂盒（绿色）检测）、兔抗平滑肌肌动蛋白抗体（使用 Alexa Fluor 488 酪胺 SuperBoost 试剂盒（红色）检测）和兔抗 Ki67 抗体（使用 Alexa Fluor 594 酪胺 SuperBoost 试剂盒检测，蓝色）来标记组织样品。在每次抗体标记之间，在柠檬酸盐缓冲液（pH = 6）中用高功率微波加热组织样品至沸腾（约 2 min），然后用 20% 功率微波加热组织样品 15 min，最后冷却组织样品至室温，然后再使用下一个兔抗体进行后续标记。

ICC 和 IHC 酪胺信号放大(续)

酪胺 SuperBoost 试剂盒

- Invitrogen™ 内源性生物素封闭试剂盒 (货号 E21390)
- Thermo Scientific™ 柠檬酸盐缓冲液浓缩液 (pH = 6.0) (货号 005000)
- Invitrogen™ ProLong™ Diamond 抗淬灭封片剂或 Invitrogen™ SlowFade™ Diamond 抗淬灭封片剂 (货号 P36961 或货号 S36963)

方案

制备试剂

1. **100X 酪胺母液:** 在 150 μ L (可用于 150 个载玻片) 或 50 μ L (可用于 50 个载玻片) DMSO (组分 E) 中溶解 Alexa Fluor 酪胺试剂 (组分 C1)。倒置试剂瓶多次晃动来溶解可能附着在试剂瓶内壁的任何酪胺。装入密封试剂瓶的 100X 酪胺母液可以在 2~8°C 下储存 6 个月。尽可能在干燥环境下存放试剂瓶。
2. **100X H₂O₂ 溶液:** 向 1 mL 蒸馏水中加入 1 滴 (约 50 μ L) 过氧化氢溶液 (组分 C2)。
3. **1X 反应缓冲液:** 向 1 mL 蒸馏水中加入 1 滴 (约 50 μ L) 20X 反应缓冲液。
4. **反应终止剂母液:** 向一瓶反应终止剂 (组分 D) 中加入 1.45 mL 95% 乙醇。涡旋试剂瓶来溶解附着在试剂瓶内壁的任何反应终止剂。使用前, 在 PBS 中稀释 (稀释比例为 1:11) 反应终止剂母液, 制成工作溶液。未使用的母液可以在 -20°C 下储存 6 个月。
5. **反应终止剂工作溶液:** 在 PBS 中稀释 (稀释比例为 1:11) 反应终止剂母液 (在步骤 4 中制备)。注意: 使用当天制备的新鲜反应终止剂工作溶液。

重要说明

开盖前请先将试剂平衡至室温。

说明

使用当天制备的新鲜 100X H₂O₂ 溶液。

说明

使用当天制备的新鲜 1X 反应缓冲液。可以使用等效的 Tris 缓冲液 (pH = 7.4) 替代反应缓冲液。也可以使用其他 HRP 酶兼容缓冲液替代反应缓冲液, 但尚未经过测试。

制备细胞样品: 固定和破膜

根据标准的细胞固定和破膜方案来固定和破膜细胞。如果存在荧光蛋白 (GFP/RFP), 我们建议使用 Image-iT 固定 / 破膜试剂盒 (货号 R37602) 来制备细胞。

方案指南

- 可以使用疏水屏障笔 (蜡笔) 来阻止液体试剂从样品载玻片或盖玻片上流失。
- 不要让细胞或组织样品变干。
- 如需孵育更长时间, 我们建议使用湿箱 (如放有湿纸巾的有盖箱子)。

制备组织样品

酪胺 SuperBoost 系统与所有类型的组织（可以使用标准 IHC/FISH 技术标记）兼容。根据标准 IHC 方案来脱蜡和脱水组织，然后在步骤 1 中终止组织的内源性过氧化物酶活力。

过氧化物酶标记

1. 可选：如果需要，加入足量的 3% 过氧化氢溶液（组分 C2）来处理样品，并在室温下孵育 60 min，可以终止样品的内源性过氧化物酶活力。

2. 在室温下用 1X PBS 冲洗细胞或组织 3 次。

3. 可选：如果使用 HRP 标记链霉亲和素，应按照厂商的建议来使用内源性生物素封闭试剂盒（货号 E21390），封闭样品中的内源性生物素。在进入下一步操作之前，在室温下用 1X PBS 冲洗细胞或组织 3 次。

4. 向样品中加入 2~3 滴（约 100~150 μL ）封闭缓冲液（组分 A），然后在室温下孵育 60 min。

5. 使用一抗（宿主为小鼠或兔）标记细胞或组织。如果使用内含链霉亲和素的 SuperBoost 试剂盒，应使用生物素标记一抗或其他配体。在封闭缓冲液（10% 山羊血清）或其他兼容封闭剂（如 2% BSA 或 BlockAid 封闭剂（货号 B10710））中稀释抗体或生物素标记配体，然后在室温下与细胞或组织一起孵育 60 min 或在 2~8°C 下与细胞或组织一起孵育过夜。对于荧光原位杂交（FISH），应根据厂商方案来孵育 DNA/RNA 探针。

6. 在室温下用 PBS 冲洗细胞或组织 10 min。重复此步骤三次。

7. 向细胞或组织中加入 2~3 滴（约 100~150 μL ）多聚 HRP 标记二抗或 HRP 标记链霉亲和素（组分 B），并在室温下孵育 60 min 或在 2~8°C 下孵育过夜。

8. 在室温下用 PBS 冲洗细胞或组织 10 min。重复此步骤三次。

说明

如果观察到非特异性信号，
则可以在步骤 7 中缩短孵育时长。

ICC 和 IHC 酪胺信号放大(续)

酪胺 SuperBoost 试剂盒

酪胺标记

1. 根据下表制备酪胺工作溶液。

酪胺工作溶液					
试剂	盖玻片 (18 mm × 18 mm)				
	5	10	20	50	100
100X 酪胺母液 (步骤 1)	5 µL	10 µL	20 µL	50 µL	100 µL
100X H ₂ O ₂ 溶液 (步骤 2)	5 µL	10 µL	20 µL	50 µL	100 µL
1X 反应缓冲液 (步骤 3)	500 µL	1 mL	2 mL	5 mL	10 mL

重要说明

工作溶液配制完成后, 应在 2 h 内使用。超过 2 h 后, 切勿使用。

说明

表中的体积按每个 18 mm × 18 mm 盖玻片需要 100 µL 酪胺工作溶液来计算。体积可根据盖玻片尺寸或微孔板中每孔所需的工作溶液体积来调整。

2. 向细胞或组织中加入 100 µL 酪胺工作溶液, 然后在室温下孵育 2~10 min。

3. 添加 100 µL 反应终止剂 (在步骤 5 中制备)。

4. 用 PBS 冲洗细胞或组织 3 次。

5. 仅含生物素-XX 酪胺的酪胺 SuperBoost 试剂盒: 如果使用内含生物素-XX 酪胺的试剂盒, 应按照厂商的建议来使用偶联的链霉亲和素。下表列出了一些推荐的链霉亲和素偶联物。

推荐用于检测生物素-XX 的 Invitrogen™ 链霉亲和素偶联物		
链霉亲和素偶联物	激发波长/发射波长 (nm)	货号
链霉亲和素- Alexa Fluor™ 350 偶联物	346/442	S11249
链霉亲和素- Alexa Fluor™ 405 偶联物	402/421	S32351
链霉亲和素- Alexa Fluor™ 488 偶联物	495/519	S11223
链霉亲和素- Alexa Fluor™ 555 偶联物	555/565	S21381
链霉亲和素- Alexa Fluor™ 594 偶联物	590/617	S11227
链霉亲和素- Alexa Fluor™ 647 偶联物	650/668	S21374

重要说明

步骤 2 中的孵育时长和步骤 3 中的反应终止剂添加的时间点对于获得具有特异性信号的高分辨率图像至关重要。在初始实验中, 我们强烈建议在不同的孵育时间点使用阳性对照载玻片和阴性对照载玻片来优化孵育时长。

使用不同种属来源的一抗进行多通道测定 完成步骤 4 或步骤 5 步后, 可以使用另一种酪胺 SuperBoost 试剂盒或使用标准 IHC/ICC 方案来多通道测定细胞或组织样品。

在多通道测定中, 使用不同种属来源 (与步骤 5 中所用宿主不同) 的一抗和兼容的荧光标记 (与第一个荧光标记在光谱上兼容)。

本方案在第 67 页继续

仅用于科学研究, 不可用于临床诊断。

在 IHC 中, 使用同一种属来源的一抗进行多通道检测

对于组织样品 (IHC), 酪胺 SuperBoost 试剂盒与 Toth 和 Mezey 所述的方法 1 兼容。

总而言之, 在蒸馏水中稀释 (稀释比例为 1:20) 柠檬酸盐缓冲液 (pH = 6.0 ; 浓缩) (货号 005000)。完成步骤 4 或步骤 5 步后, 将组织样品放入稀释的柠檬酸盐缓冲液 (pH = 6.0) 中, 用 100% 功率微波加热至沸腾 (1~2.5 min)。然后, 用 20% 功率微波加热 15 min。最后, 冷却组织样品 (组织样品仍在柠檬酸盐缓冲液中) 至室温。用 1X PBS 洗涤样品 2 次, 并根据需要重复“过氧化物酶标记”中的步骤 1 到“使用同一物种来源的一抗标记酪胺”中的步骤 5。使用与第一轮所用的在光谱上兼容的酪胺。

复染和检测

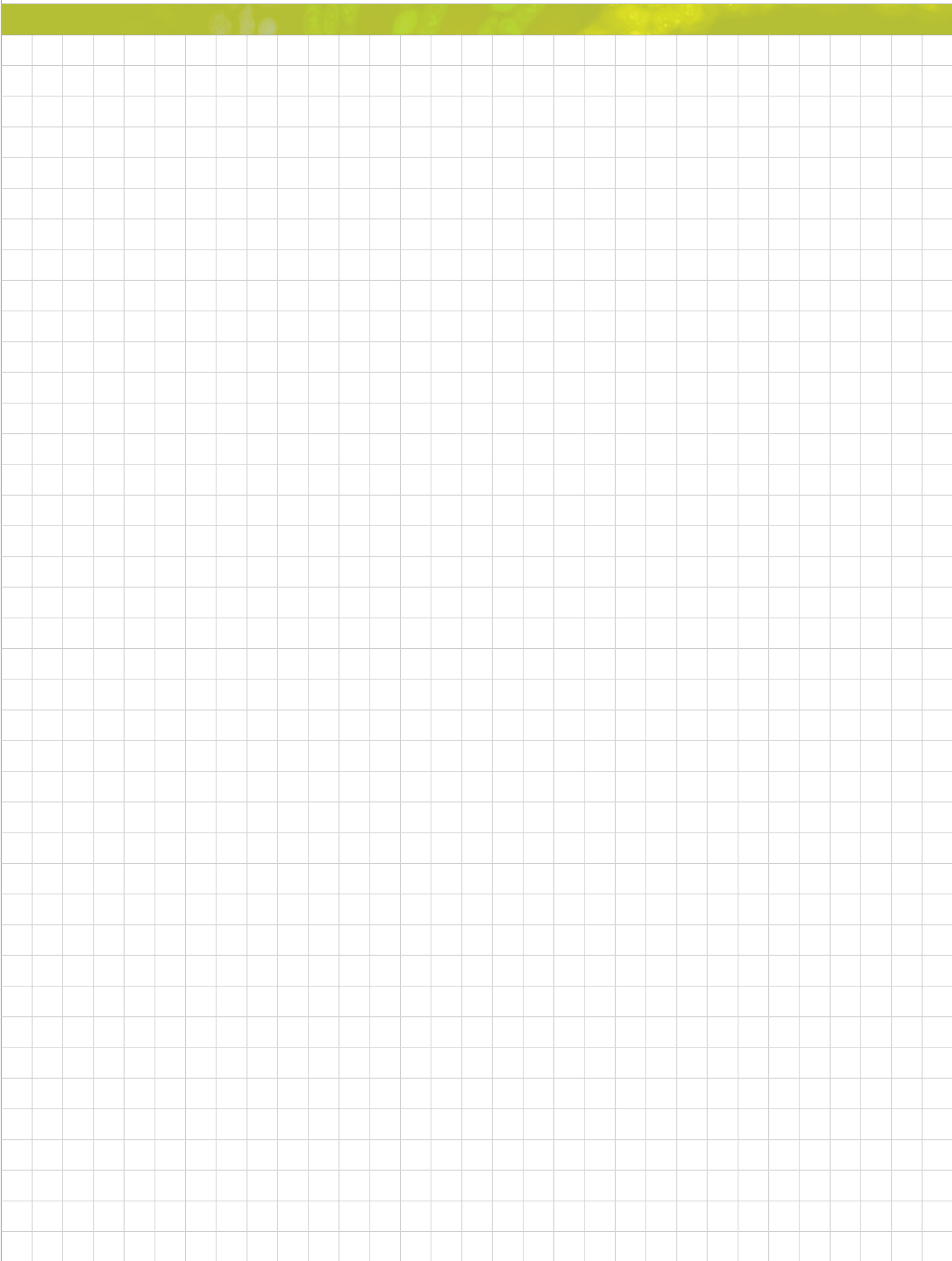
1. 根据标准方案来复染细胞或组织。下表列出了一些推荐的复染剂。

推荐用于复染的 Invitrogen™ 复染剂			
复染结构	复染剂	货号	
细胞核	NucBlue™ 固定细胞 ReadyProbes™ 试剂 (DAPI 染料)	R37606	
	NucGreen™ 死细胞 488 ReadyProbes™ 试剂 (SYTOX™ Green染料)	R37109	
	NucRed™ 死细胞 647 ReadyProbes™ 试剂 (TO-PRO-3 碘化物染料)	R37113	
肌动蛋白细胞骨架	ActinGreen™ 488 ReadyProbes™ 试剂 (AlexaFluor™ 488 鬼笔环肽染料)	R37110	
	ActinRed™ 555 ReadyProbes™ 试剂 (罗丹明鬼笔环肽)	R37112	
细胞膜	麦胚凝集素- Alexa Fluor™ 488 偶联物	W11261	
	麦胚凝集素- Alexa Fluor™ 594 偶联物	W11262	
	麦胚凝集素- Alexa Fluor™ 647 偶联物	W32466	

2. 使用抗淬灭封片剂来封片盖玻片, 如ProLong Diamond 抗淬灭封片剂 (货号 P36961) 或 SlowFade Diamond 抗淬灭封片剂 (货号 S36963)。要获得最佳结果, 请遵循封片剂随附的说明。
3. 使用兼容的成像仪器分析细胞或组织。酪胺 SuperBoost 系统与所有类型的 Invitrogen™ EVOS™ 智能细胞成像分析系统 (配备多种规格的荧光滤光片) 兼容。高内涵分析系统也已成功地用于分析载玻片和微孔板上的细胞和组织数据。

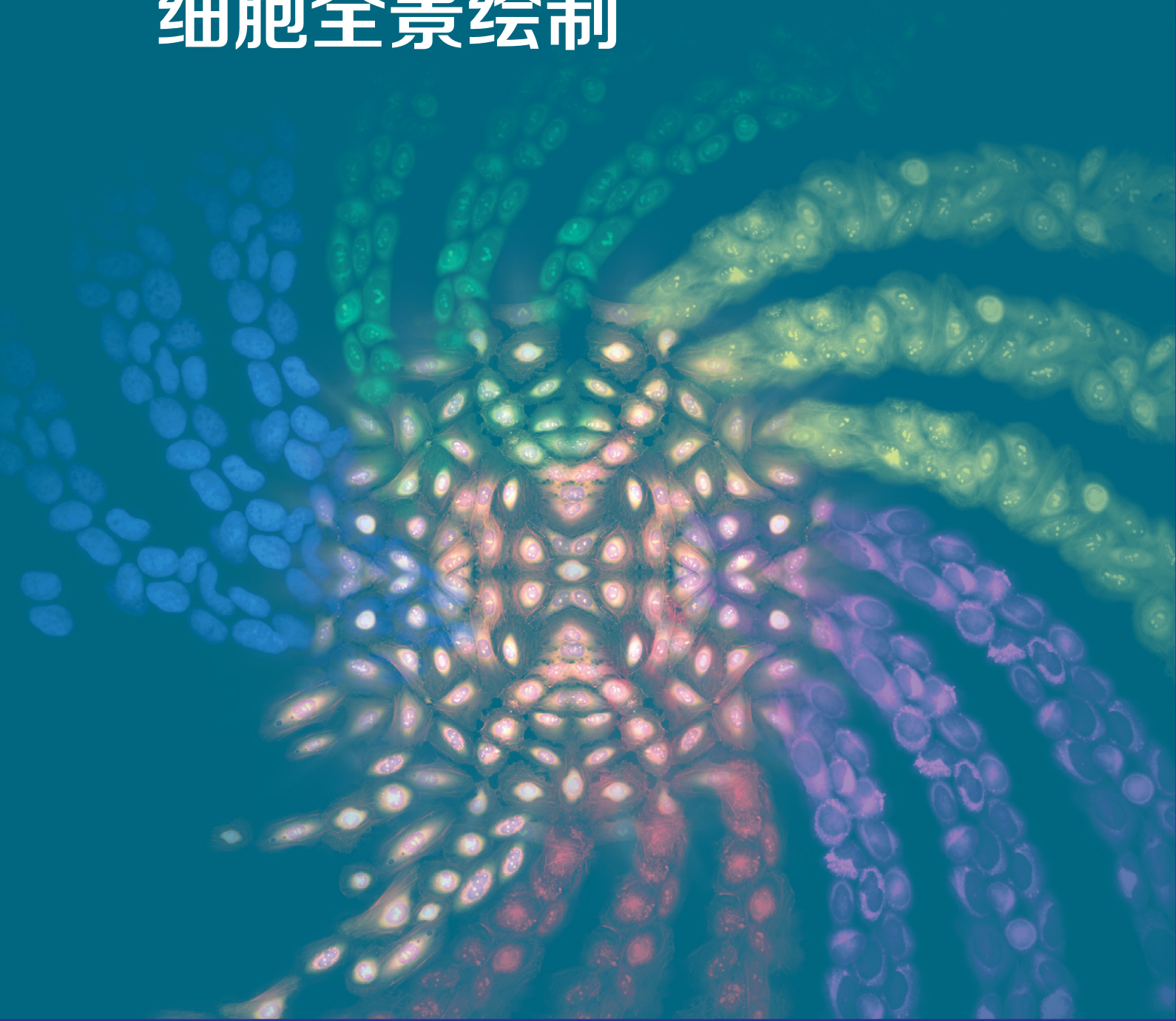
参考文献

1. Toth ZE, Mezey E (2007) Simultaneous visualization of multiple antigens with tyramide signal amplification using antibodies from the same species. *J Histochem Cytochem* 55(6):545–554. doi: 10.1369/jhc.6A7134.2007.



细胞分析

细胞全景绘制



简介

细胞全景绘制 (Cell Painting) 应用方案是由 Broad 研究所的 Anne Carpenter 及其同事共同研发, 是一种基于图像的分析工具, 有助于推动药物研发试验的发展, 还可应用到多参数筛选试验中。正如 Carpenter 及其同事最初描述的那样^{1,2}, 该工具会根据细胞大小、形状、纹理和荧光强度的变化来提取每个细胞的细胞器和形态学测量数据, 从而检测生物表型的细微变化。

细胞全景绘制作为一种表型测量工具, 其价值充分体现在综合分析能力上, 即可以从细胞骨架、质膜和细胞器水平的多参数细胞生物学研究中提取出大量的数据。这与传统高通量筛选应用形成了鲜明对比, 后者出于一般规模分析目的仅评估少量测量数据, 但在检测由化合物暴露引起的各种表型变化方面上范围有限。虽然细胞结构的形态变化是细胞全景绘制的核心, 但也评估了一些基于细胞器 (包括细胞核、核仁、内质网、高尔基体和线粒体) 的测量数据。单细胞测量数据可以从这种成像技术中提取出来, 从而能够识别相对于总细胞群而言对化合物暴露最敏感的细胞。虽然细胞全景绘制最初仅用于药物研发应用目的^{3,4}, 但后来扩展到了药物安全性评价⁵、环境毒理学⁶和基因组学应用, 包括肺癌病程的预测⁷。细胞全景绘制可以为初始研发筛选提供可能的预判, 并可以提供对传统高通量分析无法提供的系统而全面的信息。

细胞全景绘制方法

细胞全景绘制的多参数概述

细胞全景绘制可以显示八个含细胞器和形态学标记物组成的多通道图像。形态学标记物包括: Invitrogen™ Hoechst 34580 (适用于标记细胞核)、伴刀豆球蛋白 A - Alexa Fluor™ 488 偶联物 (适用于标记内质网)、SYTO 14™ Green 荧光核酸染料 (适用于标记核仁和细胞质 RNA)、麦胚凝集素 (WGA) - Alexa Fluor™ 555 偶联物 (适用于标记高尔基体和质膜)、Alexa Fluor™ 568 鬼笔环肽 (适用于标记肌动蛋白细胞骨架)、MitoTracker™ Deep Red FM 染料 (适用于标记线粒体和测量与强度成比例的线粒体膜电位 (图 22))。

总体来看, 图像采集配置需要至少五个荧光基团和荧光通道才可以完全捕获八个标记物数据。

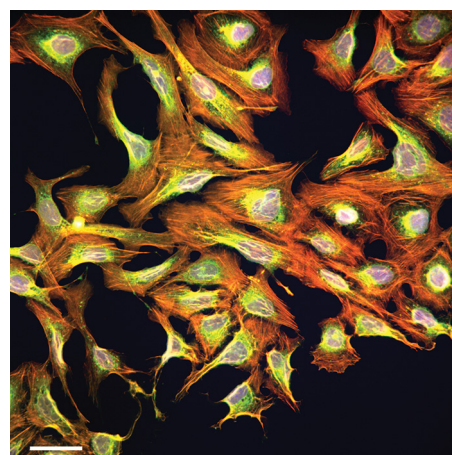


图 22. U2OS 细胞的细胞全景绘制应用方案。使用 Image-iT 细胞全景绘制试剂盒标记细胞, 然后在配备 20X 0.7 NA 物镜的 CellInsight CX7 LZR Pro HCS 平台上采集并分析数据, 筛选出“细胞核” (通道 1)、“内质网、细胞质 RNA 和核仁” (通道 2)、“高尔基体和质膜” (通道 3)、“线粒体” (通道 4)、“肌动蛋白” (通道 5), 并获得所有 (5 个) 通道的红、绿、蓝 (RGB) 伪彩图像。

细胞全景绘制 (续)

方案

使用 Image-iT 细胞全景绘制试剂盒 (货号 I64000) 对细胞进行标记为促进细胞全景绘制分析的发展, 我们推出了适用于 Thermo Scientific™ CellInsight™ CX7 Pro 高内涵平台的 Thermo Scientific™ Image-iT™ 细胞全景绘制试剂盒和细胞全景绘制分析方案。

制备母液

1. 向 5 mL ddH₂O 中加入 5 mg Hoechst 34580, 制成 1 mg/mL 溶液 (2,000X)。
2. 向 1 mL 0.1 M 碳酸氢钠 (pH 约为 8.3) 中加入 5 mg 伴刀豆球蛋白 A - Alexa Fluor 488 偶联物, 制成 5 mg/mL 溶液 (50X)。
3. 向 5 mL ddH₂O 中加入 5 mg WGA - Alexa Fluor 555 偶联物, 制成 1 mg/mL 溶液 (666X)。
4. 向 150 µL DMSO 中加入 300 个单位的 Alexa Fluor 568 鬼笔环肽, 制成 66 µM 溶液 (400X)。
5. 向 91.98 µL DMSO 中加入一瓶 MitoTracker Deep Red FM 染料, 制成 1 mM 溶液 (2,000X)。

说明

SYTO 14 Green 荧光核酸染料无需制备, 试剂盒中会提供, 规格为 5 mM 溶液 (1,666 X)。

细胞全景绘制标记流程

1. 将细胞按每孔 1,000 个细胞接种到 384 孔板的培养基中 (40 µL 细胞混悬液/孔), 或者按每孔 4,000 个细胞接种到 96 孔板的培养基中 (100 µL 细胞混悬液/孔)。
2. 在室温下孵育 60 min, 然后在 37°C、5% CO₂ 和约 95% 相对湿度条件下孵育约 20 h, 让细胞可以在夜间复苏和生长。

说明

这些条件适用于 U2OS 细胞。对于其他类型的细胞, 可优化条件来获得最佳结果。

- 第二天, 在 DMSO 中制备 10X 测试化合物, 稀释 (稀释比例为 1:10), 然后分到每个孔中 (测定浓度为 10 μ M), 然后在 37°C、5% CO₂ 和约 95% 相对湿度条件下孵育微孔板 24~48 h。为了避免 DMSO 载体效应, 一定要将 DMSO 的终浓度保持在 0.5% 以下。
- 向 10 mL 完全培养基中加入 50 μ L 母液 (1 mM), 制成 MitoTracker Deep Red FM 染料的 10X 染色液。稀释 (稀释比例为 1:10), 然后将培养基分到每个孔中 (终浓度为 500 nM)。
- 在 37°C、5% CO₂ 和约 95% 相对湿度条件下孵育 30 min。
- 制备 8% 多聚甲醛 (PFA) 固定溶液 (不含甲醇), 稀释 (稀释比例为 1:2), 然后分到每个孔中 (终浓度达到 4% PFA)。
- 在室温下孵育 15 min。
- 除去上清液, 替换为 0.1% Triton™ X-100 溶液。
- 在室温下孵育 15 min。

重要说明

切勿除去培养基。

染料 (母液浓度)	Hoechst 34580 (1 mg/mL)	伴刀豆球蛋白 A - Alexa Fluor 488 偶 联物 (5 mg/mL)	SYTO 14 染料 (5 mM)	麦胚凝集素- Alexa Fluor 555 偶联物 (1 mg/mL)	Alexa Fluor 鬼笔环 肽568
母液稀释比例	1:2,000	1:50	1:1,666	1:666	1:400
孔中的终浓度	1 μ g/mL	0.1 mg/mL	3 μ M	1.5 μ g/mL	165 nM
稀释缓冲液	1X HBSS + 1% BSA				

细胞全景绘制 (续)

10. 除去上清液, 替换为 Alexa Fluor 568 鬼笔环肽、伴刀豆球蛋白 A - Alexa Fluor 488、Hoechst 34580、麦胚凝集素 (WGA) - Alexa Fluor 555 和 SYTO 14 Green 荧光染料的稀释溶液 (按照下表稀释比例在 1X HBSS + 1% BSA 中稀释)。
11. 倒掉溶液, 用 1X HBSS 洗涤 2 次。
12. 用 1X HBSS/0.05% 叠氮化钠处理, 防止细菌生长。
13. 用黏性封板膜密封微孔板。密封完成后, 利用高内涵平台进行检测。

CellInsight CX7 LZR Pro 高内涵成像筛选分析平台和细胞全景绘制程序配置

我们已经为 Thermo Scientific™ CellInsight™ CX7 Pro 系列仪器 (包括 Thermo Scientific™ CellInsight™ CX7 Pro 平台 (LED 光源型号) 和 Thermo Scientific™ CellInsight™ CX7 LZR Pro 平台 (7 激光光源型号) 开发了适用的细胞全景绘制应用程序。上述两种仪器上的图像采集都使用了背照式科学 sCMOS 相机, 可以达到 8 个标记物同时筛选的最佳检测能力。值得注意的是, 与 LED 型号相比, 由激光激发的光谱带宽更窄, 所以利用 CellInsight CX7 LZR Pro 平台可实现更优的荧光特异性。依托全自动扫描功能, 包括可以实现在每个孔上进行的激光自动聚焦。这两款仪器还利用了 HCS Studio 软件的实时分析功能, 协助实现了图像的同步采集和分析; 所用的 20X 物镜获得了多个视场数据, 因此可以单独分析所需数量的细胞。可利用“孔内暂停”功能调节所需观测的细胞数量, 以监测更多的细胞。

U2OS 细胞的细胞全景绘制结果

可以对从细胞全景绘制程序中生成的结果数据平均值在每个孔的细胞群水平上进行评估, 也可以对每个经过验证的 U2OS 的单细胞测量值进行评估。出于其他质量控制方面的考虑, 可以显示散点图上每个细胞的细胞水平切面。图 23 显示了细胞全景绘制程序绘制出的未经处理的细胞与药理对照细胞的表型变化。

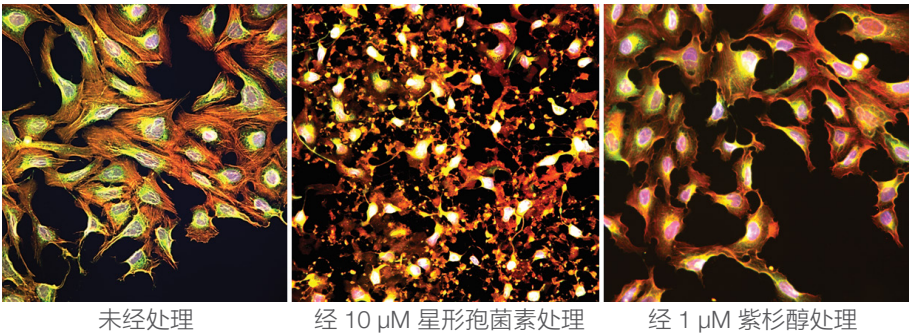
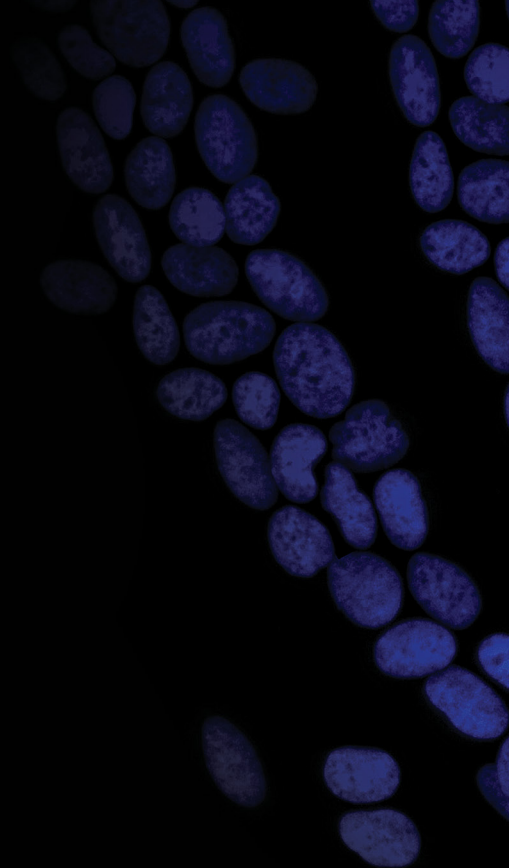


图 23. 未经处理 U2OS 细胞与药理对照 U2OS 细胞的表型比较。在 96 孔板中, 用终浓度为 1~100 μM 的目标化合物处理细胞 48 h。用目标化合物处理后, 立即使用 Image-iT 细胞全景绘制试剂盒来标记细胞, 然后使用 CellInsight CX7 LZR Pro 高内涵平台来采集数据并进行分析。

参考文献

1. Gustafsdottir SM et al. (2013) Multiplex cytological profiling assay to measure diverse cellular states. *PLoS One* 8(12):e80999.
2. Bray MA et al. (2016) Cell painting, a high-content image-based assay for morphological profiling using multiplexed fluorescent dyes. *Nat Protoc* 11(9):1757–1774.
3. Schneidewind T et al. (2020) Morphological profiling identifies a common mode of action for small molecules with different targets. *ChemBioChem* 21:3197–3207.
4. Rietdijk J et al. (2021) A phenomics approach for antiviral drug discovery. *BMC Biol* 19(1):156.
5. Seal S et al. (2021) Comparison of cellular morphological descriptors and molecular fingerprints for the prediction of cytotoxicity- and proliferation-related assays. *Chem Res Toxicol* 34(2):422–437.
6. Nyffeler J et al. (2020) Bioactivity screening of environmental chemicals using imaging-based high-throughput phenotypic profiling. *Toxicol Appl Pharm* 389:114876.
7. Caicedo JC et al. (2022) Cell painting predicts impact of lung cancer variants. *Mol Biol Cell* 33(6):ar49.



了解更多信息, 请访问 thermofisher.cn/cellimaging



赛默飞
官方微信



赛默飞
生命科学小助手

免费服务电话: 800 820 8982/400 820 8982
信息咨询邮箱: cnbidmarketing@thermofisher.com
www.thermofisher.cn

ThermoFisher
SCIENTIFIC

仅用于科学研究, 不可用于临床诊断。© 2022 Thermo Fisher Scientific Inc. 保留所有权利。所有商标均为 Thermo Fisher Scientific Inc. 及其子公司的资产, 除非另有指明。B-27 是 Southern Illinois University 的商标。Cy 是 Cytiva 的注册商标。Cytek、Aurora 和 SpectroFlo 是 Cytek Biosciences 的商标。Hoechst 是 Hoechst GmbH 的商标。Triton 是 Dow 的商标。Olympus 是 Olympus Corporation 的商标。Parafilm 是 Amcor Flexibles North America, Inc. 的商标。Pluronic 是 BASF Corp. 的商标。TSA 是 PerkinElmer, Inc. 的商标。EXT3524 1022