# 免疫荧光(IF)实验指南--冰冻切片

*本方案为通用方案，仅供参考

冰冻切片免疫荧光（Frozen Section Immunofluorescence, IF）是一种快速、高灵敏度的组织蛋白定位技术，核心优势在于最大程度保留抗原活性，特别适合检测磷酸化蛋白、膜受体、细胞因子等易失活抗原。

## 一、 样本前处理（固定+脱水）

**取材：**新鲜组织立即修剪至 1cm×0.8cm×0.5cm，去除血污与脂肪，用滤纸吸干表面水分（避免冰晶）。

**固定（可选，用于长期保存 / 保护抗原）：**浸入 4%多聚甲醛（abs9179）或其他固定液中，4℃固定 12－24 h（固定液≥组织 10 倍）。

**梯度蔗糖脱水：**15% 蔗糖（abs42027828），4℃过夜至沉底。换 30%蔗糖，4℃过夜至沉底（也可省略 15%，直接 30%）。

包埋（OCT）模具底加少量 OCT 包埋剂（abs9756，110mL），放入组织，调整切面方向，加满 OCT，包裹组织块，避免气泡，放入液氮/干冰上方 10－20s 速冻（勿浸入液氮）。如果暂时不考虑切片，冻块可锡纸包裹-80℃保存。

abs9756 OCT 包埋剂

OCT 包埋过程（*图片来源与网络，仅做学习参考用）

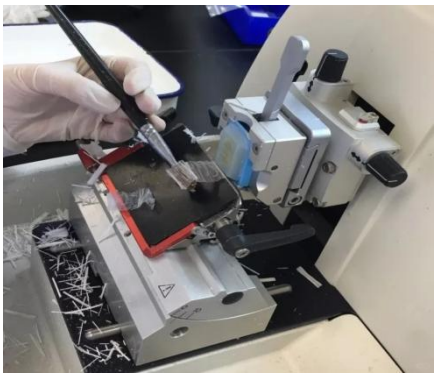
## 二、 切片（冰冻切片机）

**预冷：**切片机提前 1.5－2 h 开机，舱温 -18～-22℃，刀架/样品台同步预冷。

**修块：**去除多余 OCT，暴露组织面。

**切片：**厚度 5－10 μm（常用 8 μm），防卷板辅助，毛笔轻拉切片。

**贴片：**室温防脱玻片（如多聚赖氨酸玻片）贴片，室温晾干 15－30 min。



冰冻切片切片过程（*图片来源与网络，仅做学习参考用）

## 三、 后固定与通透（用于染色）

**后固定：** 4% 多聚甲醛（abs9179）室温固定 10 min，PBS 洗 3×5 min。

**通透：** 0.1% Triton X-100（PBS 配）室温 5 min，PBS 洗 3×5 min。

> **固定**是保持抗原细胞和亚细胞结构固定不变，同时又能使抗体进入到细胞和亚细胞的所 有部位。
> **通透**仅用于抗体需进入细胞内检测蛋白时，包括细胞内蛋白和抗原表位位于胞内区的跨膜蛋白检测。
> *固定和通透方法的选择取决于抗原表位和抗体本身的灵敏性，有时需要优化。

## 四、染色

**血清封闭:**为防止内源性非特异性蛋白抗原的结合，需要在一抗孵育前先用 3-10%的血清(与二抗来源一致)封闭，减弱背景着色。推荐 5%山羊血清将样本完全覆盖，切片需放置于湿盒内，置于 37℃恒温恒湿培养箱孵育 30min；

**一抗孵育条件:**在免疫组化实验中一抗孵育条件非常重要，一抗孵育温度有几种:4 度、室温、37 度，其中 4 度效果最佳，背景最干净，孵育时间与温度、抗体浓度有关，一般 37 度 1-2h，4 度过夜(从冰箱拿出后 37 度复温 45min)。具体条件需要根据预实验的结果进行调整。

**二抗孵育条件:**一般室温或 37 度 30min-1h，避光孵育。在免疫荧光中一般先把二抗浓度和孵育时间先定下，然后去摸索一抗浓度和孵育时间。

> **关于切片清洗:**为了防止一抗、二抗等试剂残留而引起非特异性染色，所以适当地加强清洗(延长时间和增多次数)尤为重要，一般在一抗孵育前的清洗是 3min*3 次，而一抗孵育后的清洗均为 5 次*5min。

**复染:**目的是形成细胞轮廓，从而更好地对目标蛋白进行定位。一般常用 DAPI(abs47047616)在 37℃孵育 10～20 分钟。

**封片:**为了长期保存，一般用缓冲甘油等封片，此外还有专门的抗荧光萃灭封片液。

封片

封片时要避免产生气泡，方法是直接在载玻片组织上滴一滴封片液，然后一手拿住盖片某一拐角，而另一手拿对面的那个拐角，接近封片液近端的拐角先降低，直至接触到液体时为止;当发现液体接触面在不断弥散时，则可以缓慢降低另一拐角。

**拍照:**有条件的话最好立即拍照，若不能及时拍照，也要封好片和用指甲油封固，保持避光和湿度。

使用荧光显微镜注意严格按照荧光显微镜出厂说明书要求进行操作，不要随意改变程序;应在暗室中进行检查;防止紫外线对眼睛的损害，在调整光源时应戴上防护眼镜;检查时间每次以 1-2h 为宜，超过 90min，超高压汞灯发光强度逐渐下降，荧光减弱;标本受紫外线照射 3~5min 后，荧光也明显减弱或褪色;激发光长时间的照射，会发生荧光的衰减和淬灭现象;所以最多不得超过 2-3h;荧光显微镜光源寿命有限，标本应集中检查，以节省时间，保护光源。天热时，应加电扇散热降温，新换灯泡应从开始就记录使用时间。灯熄灭后欲再启用时，须待灯光充分冷却后才能点燃。一天中应避免数次点燃光源。关闭汞灯至少在开启 15-30 分钟后;标本染色后立即观察，因时间久了荧光会逐渐减弱。若将标本放在聚乙烯塑料袋中 4℃保存，可延缓荧光减弱时间，防止封裱剂蒸发;使用的玻片等载体，都必须厚度均匀，无明显的自发荧光，如果使用油镜，还必须保证镜油为无荧光镜油;电源最好装稳压器，否则电压不稳不仅会降低汞灯的寿命，也会影响镜检的效果。