


無法看到畫面顯示? 請點選[這裡](#)開啟網頁

 細胞免疫螢光染色沒有訊號或背景值過高? 18 個實用小撇步帶你遠離醜圖

細胞免疫螢光染色沒有訊號或背景值過高? 18 個實用小撇步帶你遠離醜圖

大家在做細胞免疫螢光染色 (ICC/IF) 的時候, 應該都想要拍到美美的結果圖吧? 然而理想很豐滿, 現實卻往往很骨感, 你心目中的圖片可能是這樣的...



點擊圖片觀看圖片來源

但實際上你的圖片可能是這樣



圖 A

或是這樣...



圖 B

想要擺脫醜圖, 快來試試以下幾個 Abcam 研發團隊的小撇步吧!

如果你的圖是像「圖A」這樣“黯淡無光”

如果在螢光顯微鏡下幾乎看不到目標螢光訊號, 或是僅有幾個散佈的微弱螢光點, 可以從以下幾個方面進行排查:

可能原因	ICG/IF 無訊號或訊號弱 解決方案
目標蛋白質於樣本中不表現或表現量過低	<ul style="list-style-type: none">查閱文獻, 確認使用的細胞樣本是否有表現目標蛋白質, 以及其表現量多寡以 Western Blot 驗證目前使用的樣本的確有表現目標蛋白質, 並確認其表現量建議使用間接免疫螢光染色 (Indirect IF) 以放大訊號
目標蛋白質位於細胞內, 抗體無法有效進入細胞反應	<ul style="list-style-type: none">使用甲醇 (Methanol) 或丙酮 (Acetone) 作為固定液, 可同時對細胞打洞使用甲醛 (Formaldehyde) 或福馬林類固定液時, 需額外以 0.1-0.25% Triton X-100 對細胞膜進行打洞處理; Triton X-100 含量百分比需進行測試與優化適當延長細胞打洞處理時間
樣本固定方法不當, 破壞目標蛋白質的抗原表位 (Epitope)	<ul style="list-style-type: none">更換固定液, 優化樣本固定時間
樣本儲存時間過長	<ul style="list-style-type: none">使用新鮮製備的樣本, 避免抗原被破壞
抗體無效或失效	<ul style="list-style-type: none">選擇具有 ICC/IF 實驗驗證數據的抗體產品 [ICG/IF 實驗用二抗、ICG/IF 實驗用一抗]設置陽性對照組 (例如過度表現目標蛋白質的細胞) 確認抗體效能使用新鮮配製的抗體
抗體濃度過低	<ul style="list-style-type: none">增加一抗/二抗的工作濃度, 或透過序列稀釋測試抗體最佳工作濃度 [抗體稀釋指南]建議於 4°C 避光孵育一級抗體一整晚
二級抗體無法辨識一級抗體	<ul style="list-style-type: none">確認已正確選用與一級抗體相匹配的二級抗體, 例如使用兔單株抗體作為一抗時, 應選用抗兔子的二抗 [抗體選擇指南]
螢光訊號淬滅	<ul style="list-style-type: none">螢光標定抗體需全程避光操作與孵育選用含有螢光保護劑成分的封片膠封片後立即進行影像觀察與拍攝
螢光顯微鏡濾片選擇不合適	<ul style="list-style-type: none">確認所選濾片與使用的螢光染料相匹配

如果你的圖是像「圖B」這樣“一片閃亮”

如果在螢光顯微鏡下看到成片的螢光亮點，通常是樣本、器皿的自發性螢光或是螢光標定抗體非專一性結合所導致。針對這類背景值過高的狀況，我們可以從以下幾個方面進行排查：

ICC/IF 高背景值	
可能原因	解決方案
自發性螢光	<ul style="list-style-type: none"> 改用低自發螢光材質製造的器皿 設置未染色的樣本作為對照組，以確認樣本本身的自發螢光程度 細胞在藍色波長的自發螢光較高，應避免使用藍色螢光標定抗體檢測低豐度蛋白質 舊的甲醛溶液容易產生自發螢光，建議改用新鮮配製的甲醛固定液 固定後應充分洗滌樣本，避免固定液殘留 在阻斷液中添加終濃度為 0.3 mol/L 的 Glycine，或改用非醛類固定液
樣本變乾	<ul style="list-style-type: none"> 在濕盒中孵育抗體，避免樣本乾燥
目標訊號過弱	<ul style="list-style-type: none"> 改用更亮的螢光染料 實驗條件允許下，提高樣本中的目標蛋白質表現量，例如以藥物或特定條件誘導處理細胞，促使目標蛋白質表現量增加
阻斷不充分或未使用適合的阻斷液	<ul style="list-style-type: none"> 適當延長阻斷時間 更換阻斷液，推薦使用二抗宿主血清作為阻斷液，例如二抗是 Goat Anti-Rabbit IgG 時，使用 Goat serum 作為阻斷液
抗體濃度過高	<ul style="list-style-type: none"> 適當降低抗體濃度，或透過序列稀釋測試抗體最佳工作濃度 [抗體稀釋指南]
一級抗體非專一性結合	<ul style="list-style-type: none"> 選擇具有 ICC/IF 實驗驗證數據的抗體產品 [ICC/IF 實驗用二抗] 使用與樣本不同物種來源的抗體，例如小鼠細胞樣本可選用兔單株抗體 設置陰性對照組確認抗體專一性，例如 基因剔除細胞株 (Gene knockout cell lines) 或基因減弱細胞 (Gene knockdown cell)
二級抗體非專一性結合	<ul style="list-style-type: none"> 設置不放一抗、只孵育二抗的對照組，以確認二抗專一性 改使用具有高度專一性的 預吸附二級抗體
清洗不足	<ul style="list-style-type: none"> 在 Wash buffer 中加入 Tween-20，並適當增加沖洗時間與次數
訊號光譜重疊 (多重染色)	<ul style="list-style-type: none"> 調整顯微鏡設置，一次只接收一種螢光染料訊號 盡量選擇沒有光譜重疊的螢光染料

除了以上兩種情形，您是否還有其他細胞免疫螢光染色的實驗困擾呢？歡迎洽詢 Abcam 台灣代理 [伯森生技](#) 取得個人化的技術支援服務，您可透過下方連結瀏覽更多相關資訊：

- [ICC protocol](#)
- [更多細胞免疫螢光染色實驗工具](#)
- [Abcam 最新促銷優惠活動](#)
- [Abcam 產品快速導覽](#)

 [伯森生技股份有限公司](#)

 [前往 Abcam 官方網站](#)

伯森生物科技(股)公司 Blossom Biotechnologies, Inc.

網址 www.blossombio.com 客服 0800-059668

[[線上留言諮詢](#)] [[伯森業務專員聯絡資訊](#)]

 [加入伯森生技 Line 好友 \(@blossom_biotech\)](#)

 [前往伯森生技 FB 粉絲專頁 \(@blossombiotechnologies\)](#)

*此為系統發信請勿直接回覆

若您希望取消訂閱本公司電子報，請按 [這裡](#) 寄送退訂訊息給我們，謝謝