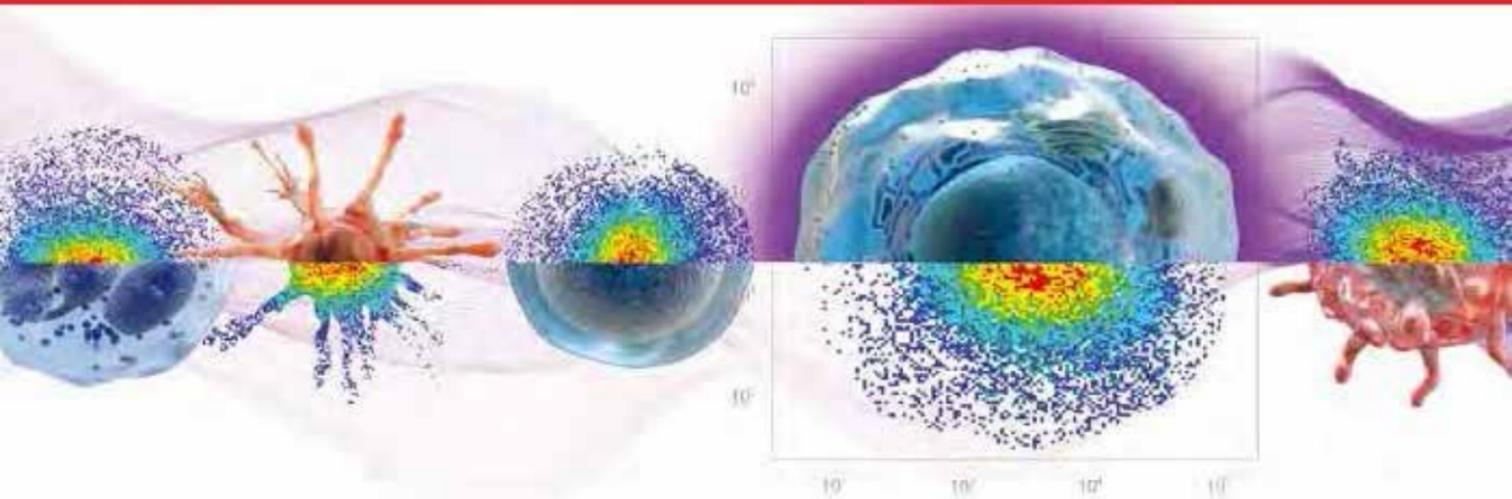
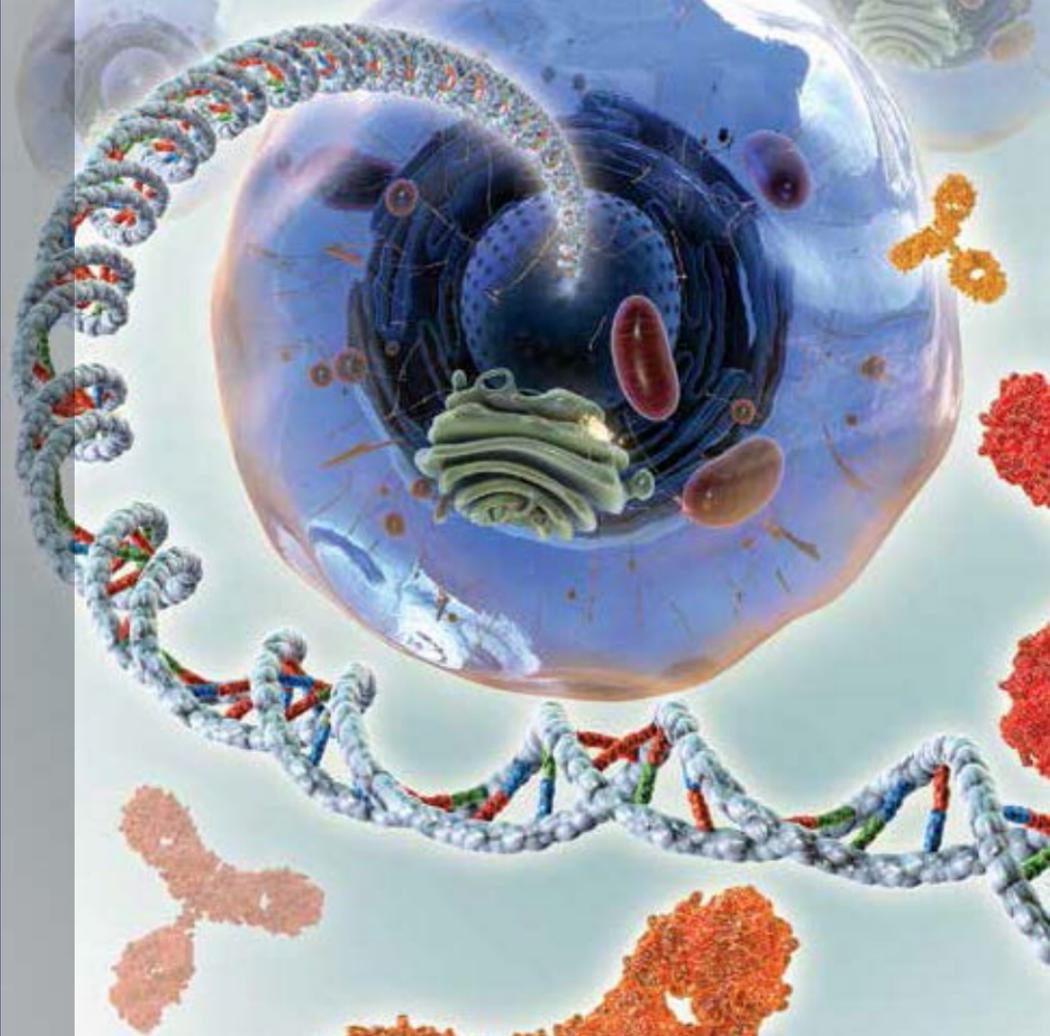


invitrogen



## 流式细胞术操作指南

**ThermoFisher**  
SCIENTIFIC



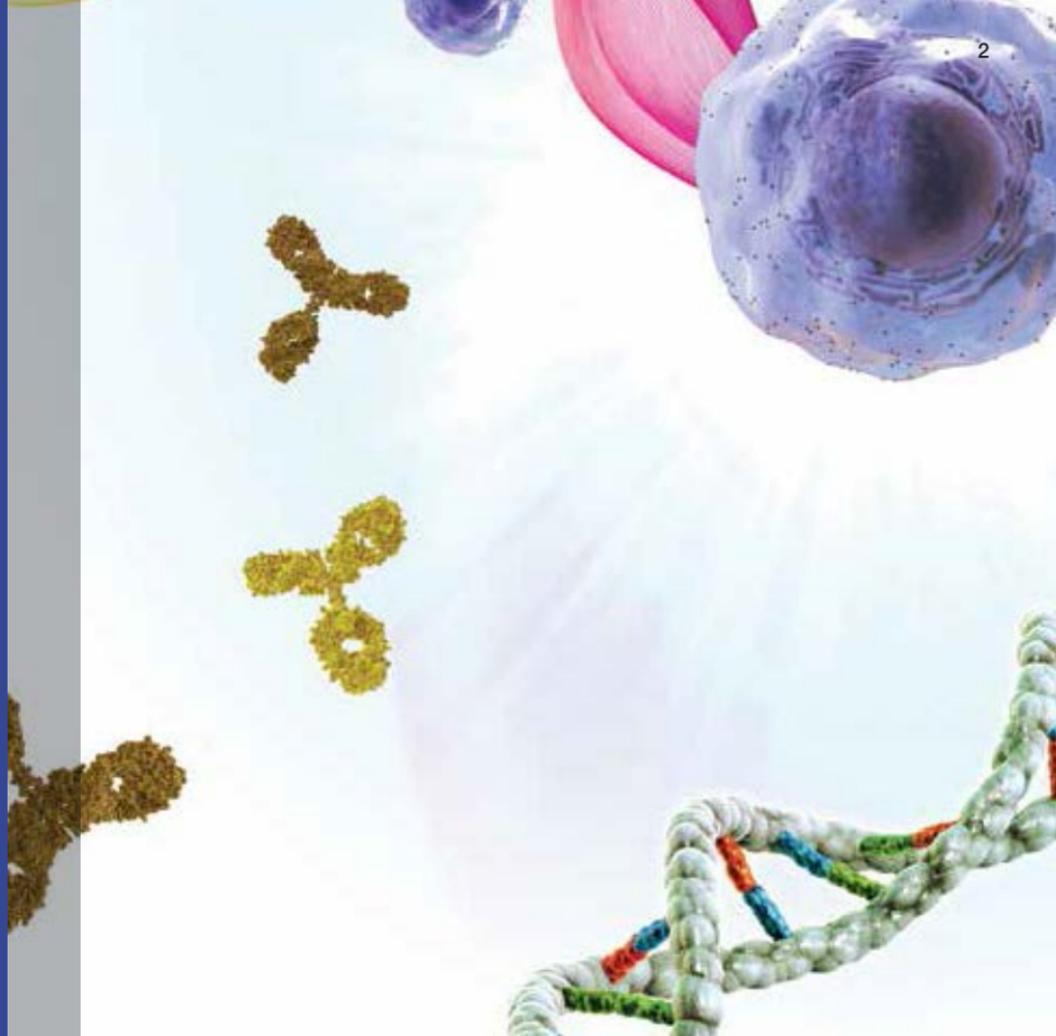
## Table of Contents

▪ 流式细胞术 . . . . .	.3
▪ 荧光染料 . . . . .	.9
▪ 抗体介绍 . . . . .	17
▪ 细胞制备 . . . . .	23
▪ 补偿调节 . . . . .	43
▪ 细胞表面蛋白染色 . . . . .	47
▪ 细胞内蛋白染色 . . . . .	57
▪ 细胞功能染料. . . . .	81
▪ 流式细胞术检测细胞凋亡. . . . .	107
▪ 故障排除 . . . . .	115

本产品指导手册中涉及到的全部产品编号 ( cat. nos. ) 参见eBioscience™ 产品列表。

### 仅供研究使用。禁止用于临床诊断目的。

© 2016 Affymetrix, Inc. All rights reserved. Affymetrix™, eBioscience™, GeneChip™, USB™, Axiom™, BestProtocols™, CoMAP™, Command Console™, CytoScan™, DMET™, eFluor™, Eureka Genomics™, eVolve™, ExoSAP-IT™, Expression Console™, eZkine™, Full Spectrum Cell Analysis™, GeneAtlas™, GeneChip-compatible™, GeneTitan™, Genotyping Console™, HotStart-IT™, Instant ELISA™, InstantOne ELISA™, MagniSort™, MagniTaq™, myDesign™, MyGeneChip™, NetAffx™, OncoScan™, OneComp eBeads™, 123Count eBeads™, Powered by Affymetrix™, PrepEase™, PrimeFlow™, PrimeView™, Procarta™, ProcartaPlex™, QuantiGene™, Ready-SET-Go!™, SAFE™, The New Standard of Excellence™, UltraComp eBeads™, VeriQuest™, VeriScript™, VersaTaq™, and ViewRNA™ 均为Affymetrix, Inc.商标或注册商标。其他全部商标均归各持有人所有。



## 流式细胞术

▪ 概述 . . . . .	4
▪ 液流系统 . . . . .	4
▪ 光学系统 . . . . .	5
▪ 数据展示 . . . . .	6
▪ 细胞分选 . . . . .	7

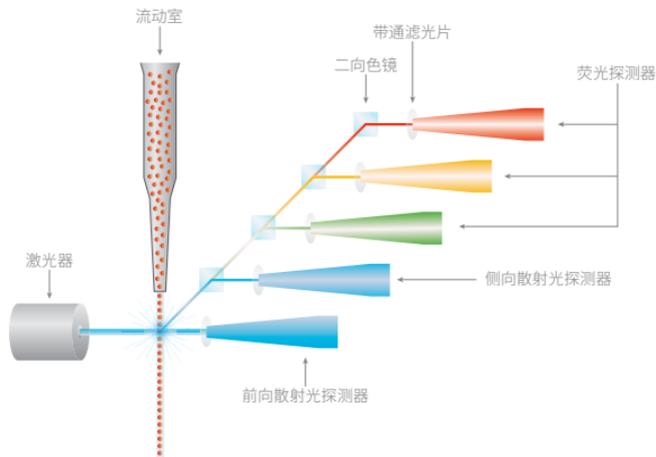
## 流式细胞术

### 概述

流式细胞术系统性地结合流体学、光学和电子系统，利用其荧光和物理特性检测各种微粒体。它是一种有效地从单细胞水平区分异质性细胞群体的技术。检测对象包括悬浮细胞、贴壁细胞或从实体组织分离的单细胞悬液。流式细胞术可用于细胞计数、细胞分选、荧光生物标志物的检测，从而能满足多参数细胞分析的需要。

### 液流系统

液流系统可通过流体动力学聚焦或声波，使单细胞悬液形成规整的单细胞流。将样本注入流动室之后，被周围压力较高的鞘液流包裹，形成单细胞排列的液流。



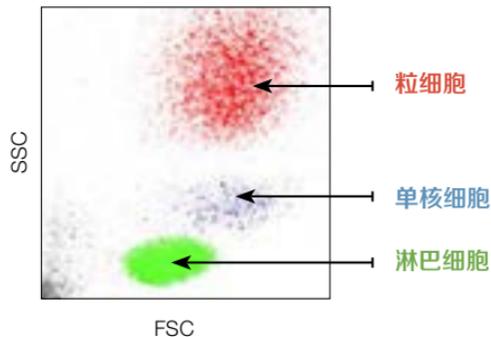
### 流式细胞术的工作原理

单个细胞排队依次通过激光照射区，一系列光学探测器收集细胞的散射光和荧光信号

## 光学系统

单细胞液流进入流动池的激光照射区，细胞发出的散射光信号和荧光信号分别由相应的探测器收集。

利用不同激光光源和不同发射波长的荧光染料，可以同时检测细胞的很多参数。与激光束同轴的透镜收集到的前向散射（FSC）反映颗粒相对大小。FSC也会受到细胞与样本缓冲液之间折射率、细胞内部结构、所用光线波长、光学采集元件位置等诸多因素的影响。相反，侧向散射（SSC）是在垂直于激光束方向收集到的光线。SSC通过分析细胞内颗粒复杂程度来区分细胞群。荧光标记抗体或功能染料发出的荧光信号通过一系列透镜和滤光片在特定波长被探测器收集。

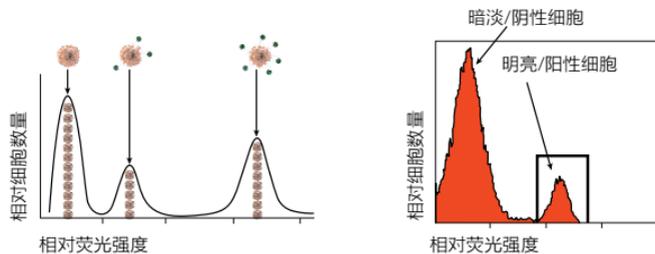


裂解红细胞后的全血散射光散点图

FSC反映细胞大小，而SSC反映细胞的颗粒度。如图所示，这些参数还可单独用于区分细胞的类型。综合运用FSC和SSC与荧光染色可以更深入了解样本细胞的特征。

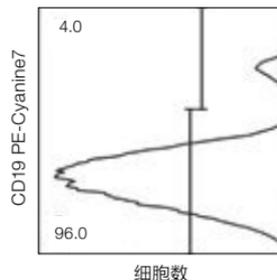
## 数据展示

流式细胞术可分析大规模的细胞样本，并形成单细胞的数据点。该技术每秒可分析数以千计的细胞。数据可用单参数的直方图或双参数的散点图表示。直方图是单参数分析的典型代表，横轴通常是荧光信号，纵轴是相对细胞数量。直方图中出现不同的峰代表表达不同荧光水平的细胞群。双参数图可以同时分析两个参数，从而对样本进行更深入复杂的探究。双参数图可分为点状图、密度图或等高线图。双参数点图可以根据两个指标的表达情况区分出很多细胞亚群。这些亚群还能通过“设门”进行进一步的分析。设门可将特定的细胞亚群区分出来，并仅对门内细胞的其它参数进行分析。



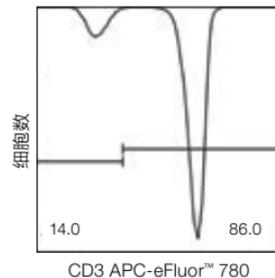
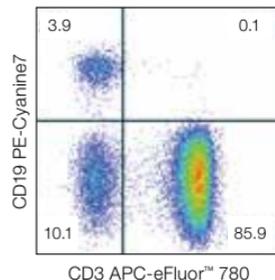
**直方图显示相对荧光强度的细胞数量。从数据可以获得的信息：**

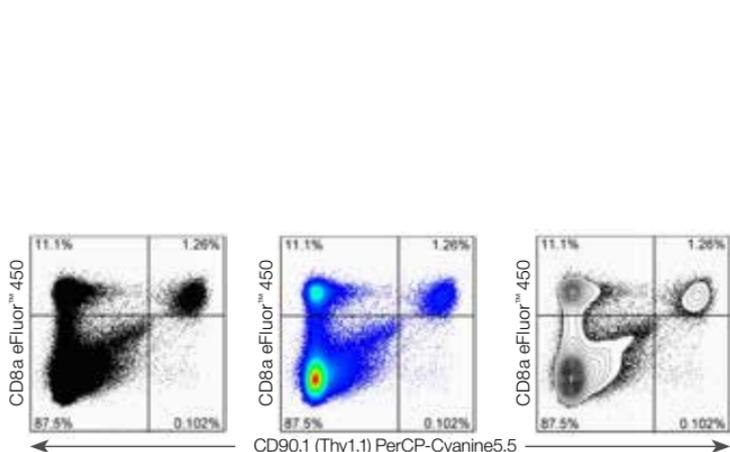
- 阳性和阴性细胞的比例
- 荧光强度的平均值或中位值 (MFI)



**双参数图**

双参数图(例如点图)可以用来区分表型。





### 点图

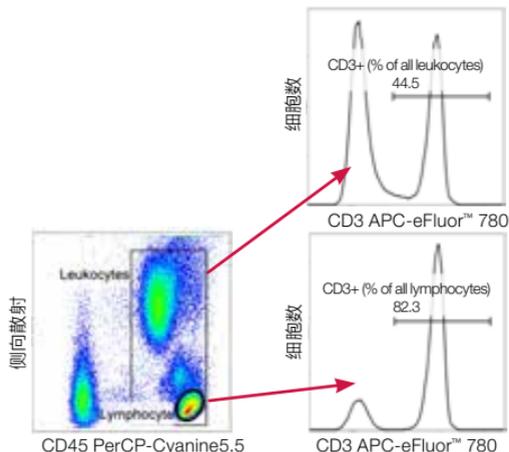
- 每个点=1个细胞
- 不提供细胞群频率的信息

### 密度图

- 数据的三维显示
- 用不同颜色表示高频细胞群

### 等高线图

- 与密度图相似
- 利用等高线表示细胞频率增高

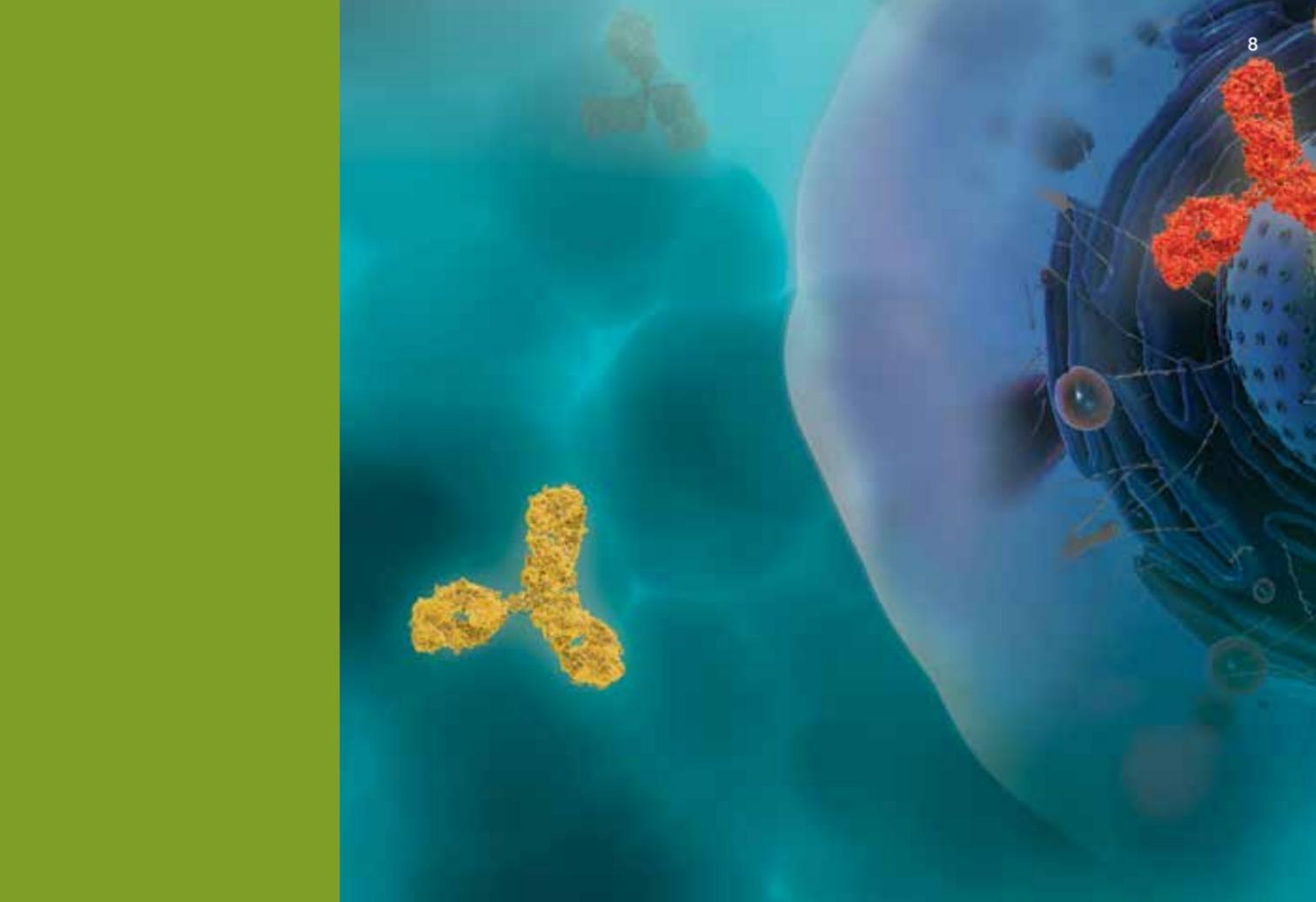


### 对感兴趣细胞群设门

- 对特定的细胞亚群进行分析, 无需物理分离
- 对特定细胞群设门, 只对此类细胞进行分析
- 获得的数据取决于如何对细胞进行设门

## 细胞分选

运用流式细胞术进行细胞分选, 可以根据其物理或荧光特征进行细胞的分离和收集。细胞经过激光照射区之后, 细胞分选仪可以生成含单个细胞的液滴。每个液滴被充电, 然后利用电场使其偏转至各类收集管或多孔板中。这些富集的细胞可用于后续实验, 例如组织培养或测序等。



## 荧光染料

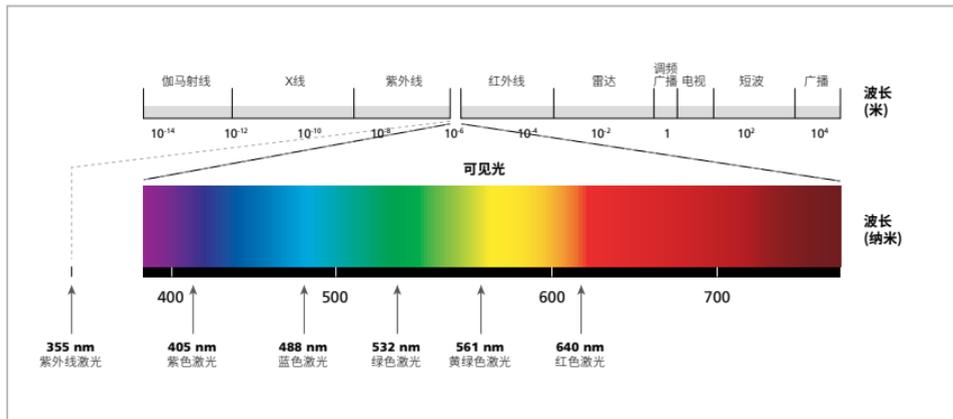
- 激发光和发射光 . . . . . 10
- 荧光补偿 . . . . . 11
- 流式细胞术激光器和荧光染料发射光谱 . . . . . 12
- 流式细胞术的荧光染料 . . . . . 14
- 偶联染料 . . . . . 15

## 荧光染料

### 激发光和发射光

荧光染料也被称为荧光素，可以吸收特定波长范围的能量，然后发射出波长较长的低能光线。激光器能够发射用来激发荧光染料的特定波长的光线。荧光染料吸收光线之后，电子处于激发状态。随着电子释放能量并返回基态，荧光染料发射出可以被流式细胞仪检测的荧光，通常以荧光强度表示。

荧光染料的选择比较复杂。选择合适的染料取决于两个主要特性：荧光染料能够被特定波长的激光激发，以及发射波长能够被光学滤镜和探测器区分。流式细胞仪中激光器与探测器的配置决定了适用的荧光染料组合。

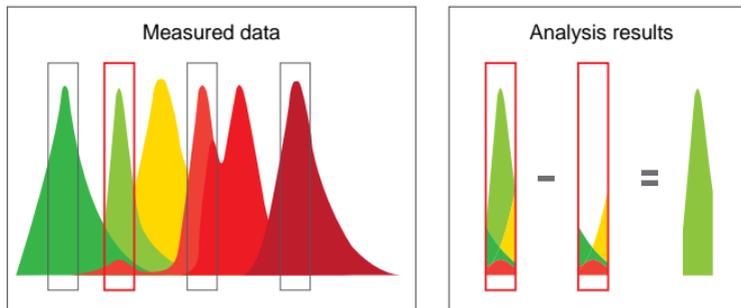


#### 紫外线-可见光光谱

紫外-可见光谱中特定波长的激光可以激发相应的荧光染料。

## 荧光补偿

在一次实验中使用两种或以上荧光染料时，有些荧光染料的部分发射光谱会溢漏到其他染料的检测通道。为确保测定到的荧光信号由一种荧光染料发出，需要进行补偿调节，从该荧光染料的信号中减去漏到该通道的其它染料的信号。为计算出补偿值，每次实验必须设置单色对照样本，测定出每种染料溢漏到其他通道的荧光信号，并通过调节补偿来减掉该溢漏的信号。补偿微球，例如UltraComp eBeads™或OneComp eBeads™，或实验中用到的抗体染色的细胞都可用作单色对照。参见第43页“补偿调节”。



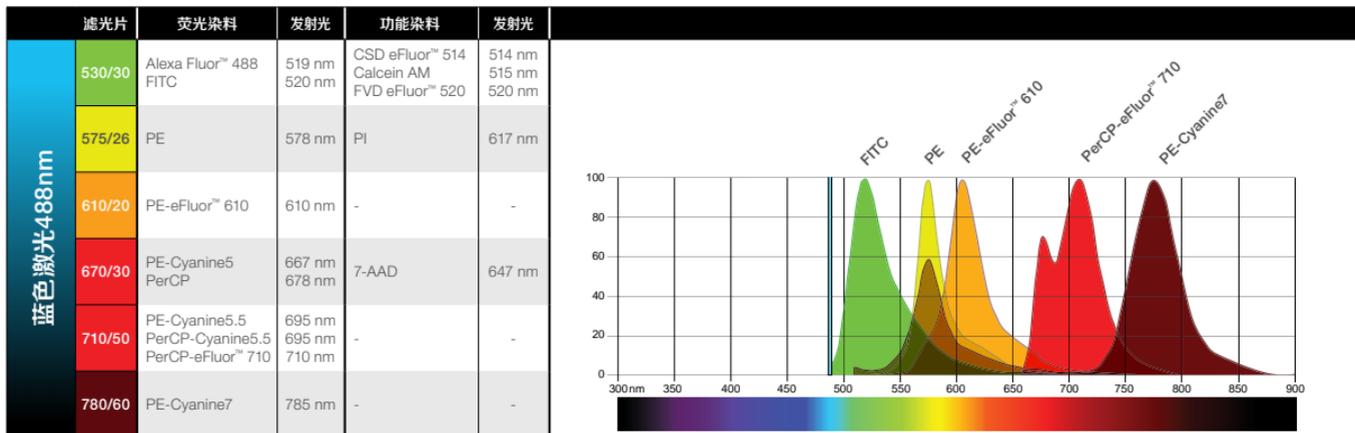
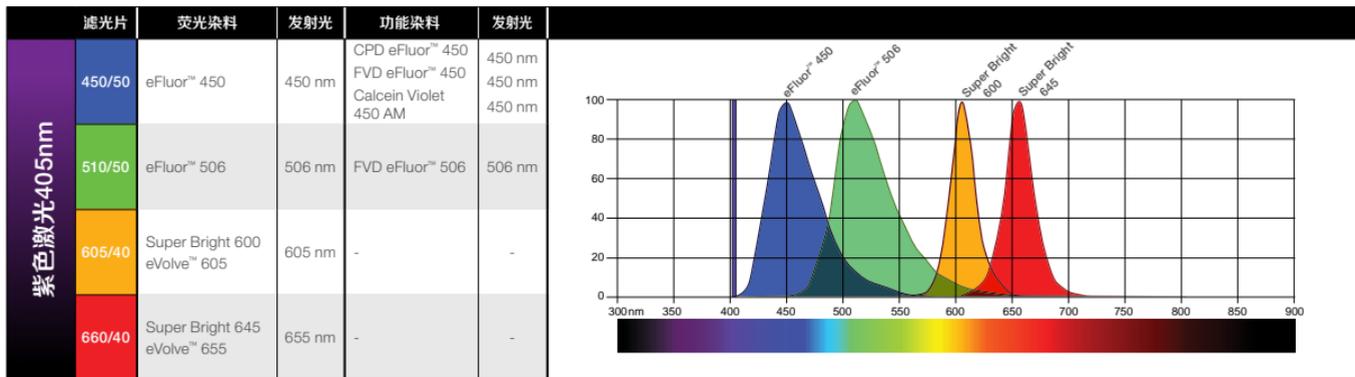
### 通过补偿消除光谱信号重叠

利用荧光补偿校正多种荧光染料导致的光谱重叠。红色长方形表示带通滤波器。为了仅检测绿色信号，必须从中减去其它信号。需要减除的信号程度可利用单色对照品进行测定。

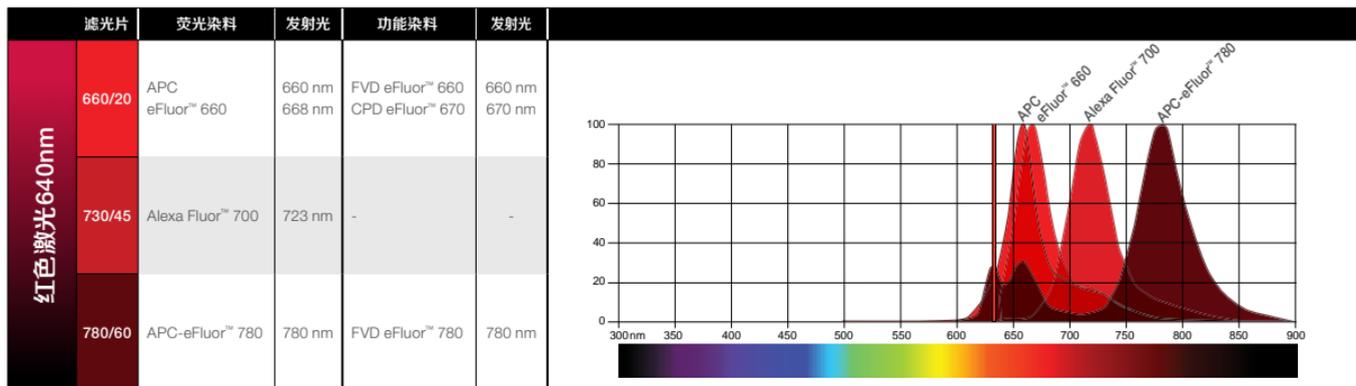
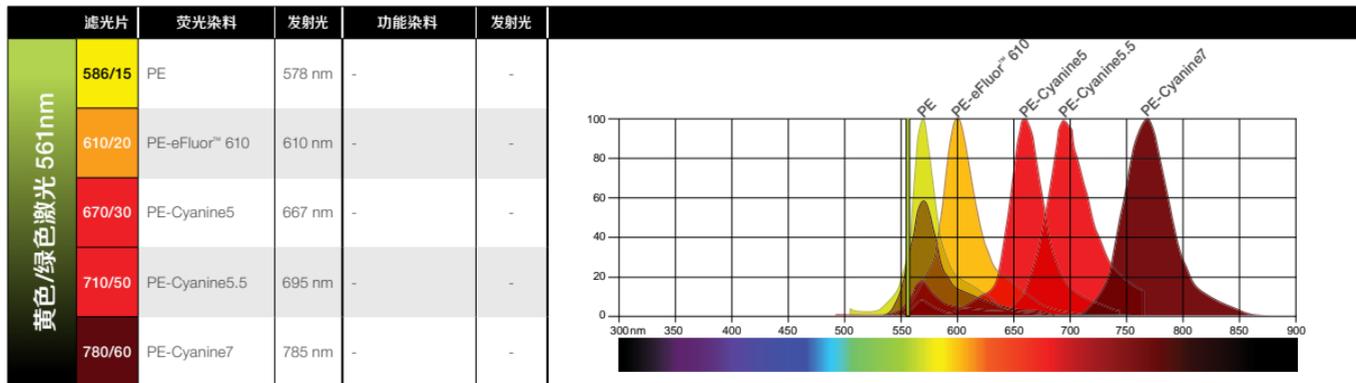
### 设置补偿对照的原则

1. 阳性细胞群和阴性细胞群的自发荧光必须相同。
2. 用于补偿的阳性群的亮度必须与实际实验中阳性群相同，或者更亮。
3. 使用与实验相同的荧光染料进行补偿调节：
  - 同一个通道中的荧光染料不能相互作为补偿对照（例如eFluor660和APC）
  - 偶联染料的对照品必须来自同一生产商，甚至有时需要同一个批号。

## 流式细胞术激光器和荧光染料发射光谱



## 流式细胞术激光器和荧光染料发射光谱



FVD - 死活细胞鉴定染料  
 CPD - 细胞增殖检测染料  
 CSD - 钙感受器染料

## 流式细胞术的荧光染料

荧光染料可以标记抗体或其他蛋白，用来特异性结合已知蛋白或分子

表型分析使用的荧光染料		
	激发波长	最大发射波长
eFluor™ 450	405 nm	450 nm
eFluor™ 506	405 nm	506 nm
Alexa Fluor™ 488	488 nm	519 nm
FITC	488 nm	520 nm
Alexa Fluor™ 532	532 nm	561 nm
PE	488 nm, 532 nm, 561 nm	578 nm
Super Bright 600	405nm	610nm
eVolve™ 605	355 nm, 405 nm	605 nm
PE-eFluor™ 610	488 nm, 532 nm, 561 nm	607 nm
Super Bright 645	405nm	660nm
eVolve™ 655	355 nm, 405 nm	655 nm
APC	640 nm	660 nm
PE-Cyanine5	488 nm, 532 nm, 561 nm	667 nm
eFluor™ 660	640 nm	668 nm
PerCP	488 nm	678 nm
PE-Cyanine5.5	488 nm, 532 nm, 561 nm	695 nm
PerCP-Cyanine5.5	488 nm	695 nm
PerCP-eFluor™ 710	488 nm	710 nm
Alexa Fluor™ 700	640 nm	723 nm
APC-eFluor™ 780	640 nm	780 nm
PE-Cyanine7	488 nm, 532 nm, 561 nm	785 nm

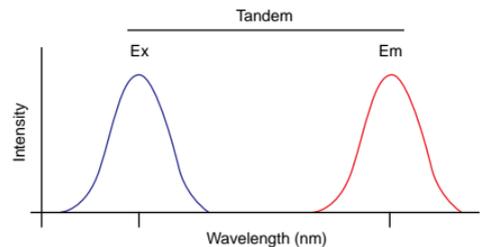
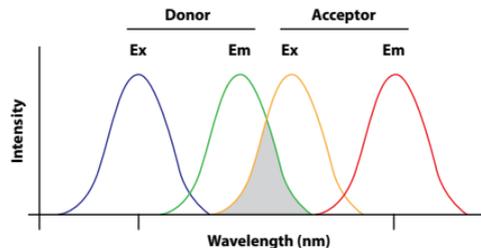
## 偶联染料

偶联荧光染料是由两种荧光分子组成的，它们是大分子蛋白类染料（供体）和小分子有机染料（受体），两者以共价键结合。供体染料可以被激光器发出的激光激发，而受体染料却不能。供体染料被激发后发射出的能量转移至受体染料，后者激发后发出特定波长的光线，该过程称为“Förster共振能量转移”或“荧光共振能量转移（FRET）”。因此，偶联染料具有供体染料的吸收光谱和受体染料的发射光谱，成为与供体染料和受体染料不同的独特荧光染料，因此增加了可被同一种激光激发检测到的荧光染料数量。

### FRET的效率取决于

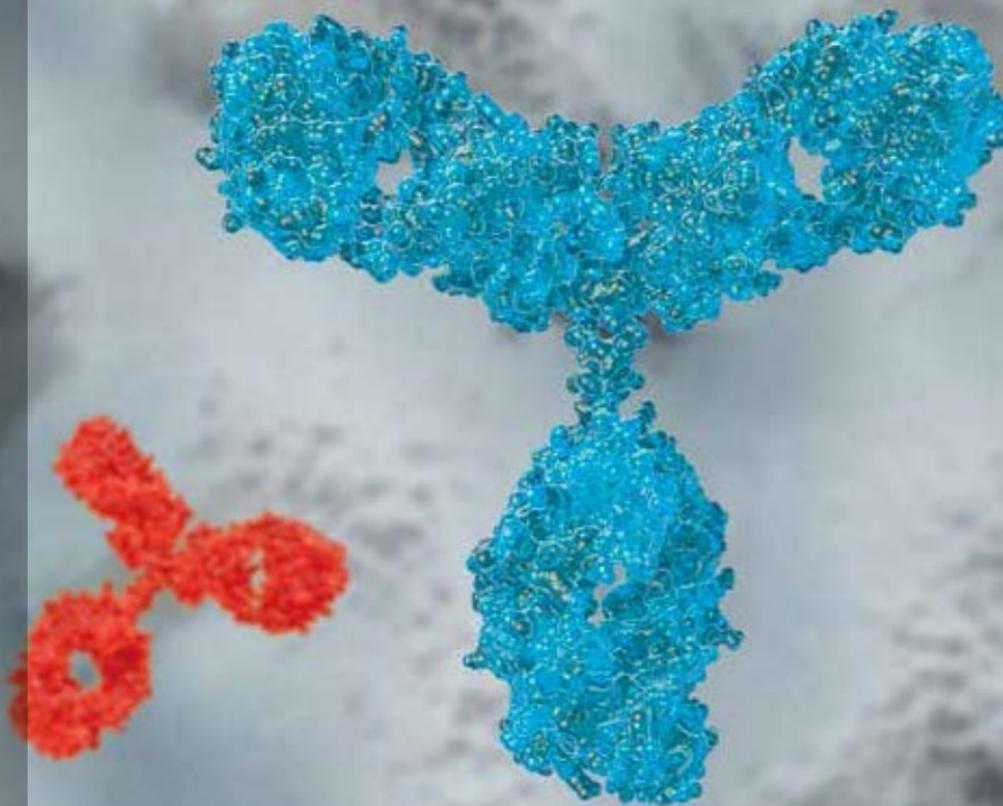
- 供体和受体之间的物理距离
- 供体和受体之间的相对位置

因为FRET的效率无法达到100%，始终有一些信号处于供体染料的通道内；但是，我们可以按照前面和第43页所述，使用单色对照品进行补偿。在补偿时必须使用与实验相同染料的抗体，这一点十分重要。因为不同厂家生产的偶联染料会略有差异。



### 偶联染料具有独特的性质

偶联染料具有供体染料的吸收光谱和受体染料的发射光谱，成为与供体染料和受体染料完全不同的独特荧光染料。



## 抗体介绍

- 挑选抗体 . . . . . 18
- 抗原表位 . . . . . 18
- 抗体特异性和交叉反应 . . . . . 18
- 抗体滴定 . . . . . 20
- 对照 . . . . . 21

## 抗体介绍

### 挑选抗体

尽管我们利用散射光信号可大致区分细胞群，但利用荧光标记抗体进行免疫表型分析可以更精确地鉴定细胞亚型。当抗体与特异性表面抗原或细胞内抗原结合后，可以同时对各种抗原进行定量分析，以区分不同细胞亚群。

### 抗原表位

抗原是刺激免疫系统产生抗体的分子。抗原表位是抗原上可被抗体识别的区域。通常每个抗原有多种表位，而单克隆抗体只识别一种抗原表位。构象表位大约由5-15个一级结构不连续的氨基酸构成，通过蛋白质折叠组合在一起。由于流式细胞术属于活细胞染色，因此能够识别原生表位的抗体很适合进行流式染色使用。若样本制备时发生靶分子变性，那么表位可能会改变，导致抗体无法识别抗原。在蛋白质变性的方案中，针对线性抗原表位（线性排列的5-15个氨基酸）的抗体相对染色效果较好。抗原表位也会受到不同固定液的影响，参见第58页“固定和破膜的优化”。

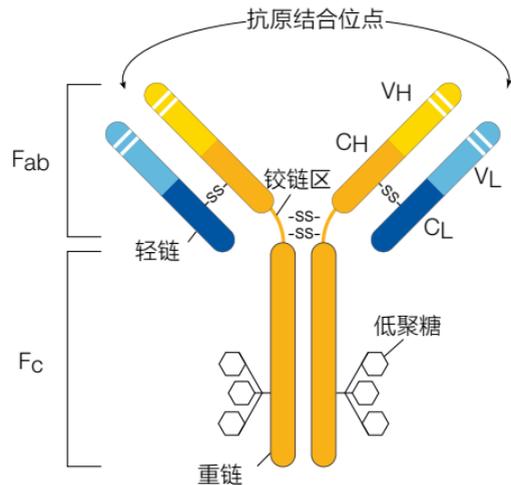
### 抗体特异性和交叉反应

特异性用来表示抗体与抗原表位结合的程度。大多数情况下，一个表位针对一种抗原；但有时不同抗原也会共享同一种表位，因此导致抗体与不同蛋白质上的相同表位发生交叉反应。抗体与不同物种的相同抗原发生交叉反应（跨物种交叉反应），或者相反，抗原特异性或物种特异性抗体的交叉反应可能会引起某些科研工作者的兴趣。

商业化的抗体会考虑到这些情况，确保反应的特异性，并兼容常规使用的染色方案。

### 选择抗体时的注意事项:

- 使用经验证适合流式细胞术的抗体, 不是所有抗体都可用于所有应用。
- 验证物种的反应性。
- 确定抗体来源的宿主物种。
- 考虑待测样本的类型。
- 考虑蛋白表达部位: 表面或细胞内。
- 当目标蛋白是活化的蛋白质时(例如: 磷酸化或剪切), 确保抗体特异性适用于识别活化的蛋白质。



### 注释

Fab = 抗原结合片段

Fc = 可结晶片段

CL = 恒定区, 轻链

CH = 恒定区, 重链

VL = 可变区, 轻链

VH = 可变区, 重链

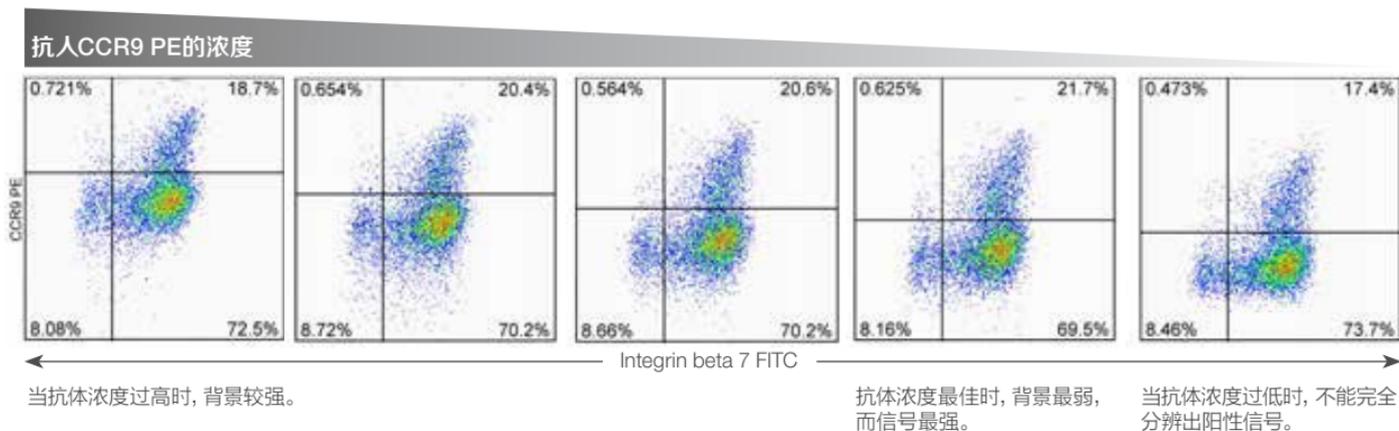
高变区

可变区

恒定区

## 抗体滴定

当首次使用抗体，或者采用不同染色条件或组织时，建议进行梯度稀释，以测定最佳的抗体稀释倍数。

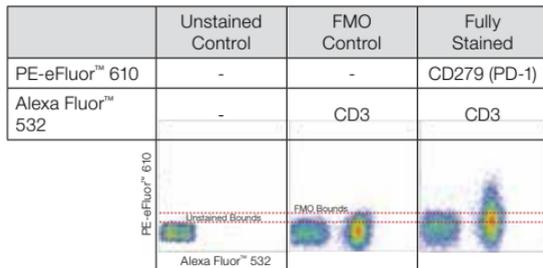


## 对照

正确使用对照可以避免出现假阳性或假阴性结果，并且有助于分析实验数据。

### 推荐使用以下对照：

- 未染色细胞以评估自发荧光
- 同型对照评估抗体Fc段与靶细胞结合（例如：B细胞、树突细胞、单核细胞）
- 内部/生物学阴性对照，评估抗体的非特异性染色（例如：未刺激对比受刺激）。
- 荧光减一对照（FMO）评估其他荧光染料的干扰和补偿本底，有助于正确设门

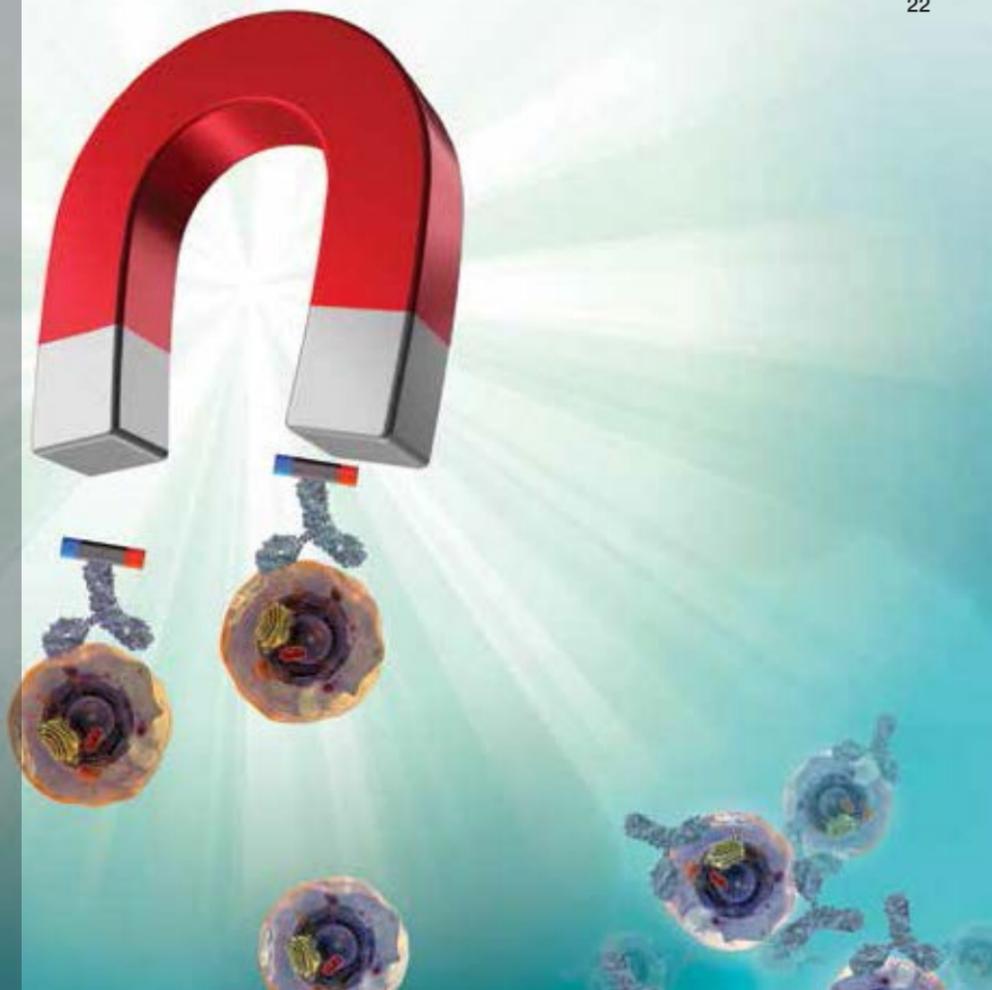


**FMO对照包含除了待评估荧光之外其他所有通道的荧光**为准确给PE-eFluor610阳性细胞设门，门应设定在FMO染色的顶端，而不是未染色对照的顶端。

	FITC	PerCP-eFluor™ 710	APC	Alexa Fluor™ 700	APC-eFluor™ 780	eFluor™ 450	eFluor™ 506	Alexa Fluor™ 532	PE	PE-eFluor™ 610	PE-Cyanine5	PE-Cyanine7
Unstained	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PE-eFluor™ 610 FMO	CD196 (CCR6)	CD194 (CCR4)	CD45RA	CD8	CD4	CD45RO	FVD	CD3	CD183 (CXCR3)	-	CD25	CD185 (CXCR5)
Full Panel	CD196 (CCR6)	CD194 (CCR4)	CD45RA	CD8	CD4	CD45RO	FVD	CD3	CD183 (CXCR3)	CD279 (PD-1)	CD25	CD185 (CXCR5)

**荧光减一对照 (Fluorescence minus one ,FMO) 用于评估多色染色的荧光背景。**

人PBMC样本12色流式方案来鉴定辅助T细胞亚群。为帮助设定CD279的门，除抗人CD279 (PD-1) PE-eFluor™ 610以外染色的样本（上组图中的中间一幅，本表的中间一行）与未染色（上组图中的左侧一幅，本表的最上一行）和全12色（上组图中的右侧一幅，本表的最下一行）结果对比。



## 细胞制备

▪ 流式细胞术的细胞制备方案 . . . . .	24
▪ 细胞解离 . . . . .	24
▪ 方案A: 培养细胞 . . . . .	25
▪ 方案B: 淋巴组织 . . . . .	26
▪ 方案C: 非淋巴样组织 . . . . .	27
▪ 方案D: 从全血中分离PBMC . . . . .	28
▪ 红细胞 (RBC) 裂解方案 . . . . .	29
▪ 方案A: 使用1X或10X红细胞裂解液 . . . . .	30
▪ 方案B: 使用一步法固定/裂解液 . . . . .	33
▪ 磁珠细胞分选方案 . . . . .	36
▪ 方案A: MagniSort™阳性分选 . . . . .	36
▪ 方案B: MagniSort™阴性分选 . . . . .	39

## 流式细胞术的细胞制备方案

### 细胞解离

所有流式细胞术检测的样本均需是单细胞悬液。因此，外周血细胞或悬浮生长的细胞最适合流式分析。贴壁细胞、实体组织或肿瘤组织在进行流式染色之前，必须制成单细胞悬液。目前可用的方案很多，涉及到酶消化或机械性的组织解离。当使用螯合剂或酶消化时，应格外小心，因为此类过程可能会破坏抗体表位。在任何情况下都应该去除细胞团块、死细胞、碎片，以便消除假阳性、获得最佳的结果。



#### Accumax细胞分离

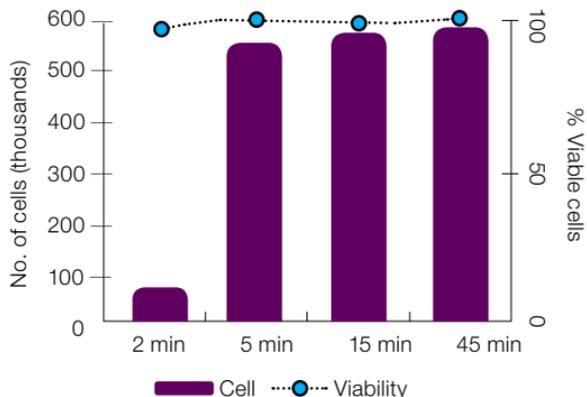
分离之前，细胞聚集；100X放大（左图）。

分离之后，相同的细胞经过Accumax (cat. no. 00-4666)处理；100X放大（右图）。

## 细胞制备 - 方案A: 培养细胞

### 材料

- Accutase™含酶细胞解离液(货号 00-4555) 或胰蛋白酶或乙二胺四乙酸 (EDTA)
- 流式细胞染色缓冲液(货号00-4222)
- 15或50mL锥形离心管



### Accutase™细胞解离液

在DMEM+10%胎牛血清 (FBS) 培养皿中培养的人MG63纤维肉瘤细胞被Accutase细胞分离液快速消化成活性很好的单细胞悬液。Accutase™解离液作用温和; 细胞在Accutase™解离液中45分钟后存活率高达97±3%。

### 实验步骤

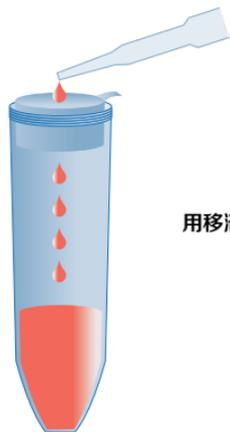
1. 对于悬浮生长的细胞, 将其轻轻倒入锥形离心试管中, 然后进行细胞计数和活性检测。前进至第4步。
2. 对于贴壁细胞, 采用下列任意一种方法从培养皿上解离细胞:
  - 细胞刮刀
  - 胰蛋白酶
  - EDTA (10 mM磷酸盐缓冲液)
  - Accutase™含酶细胞解离液
3. 将细胞倒入锥形离心试管中, 并使用移液器清除细胞团块, 然后进行细胞计数和活性检测。
4. 细胞离心后并重悬于适当体积的流式细胞染色缓冲液, 使最终浓度达到 $10^7$ 个细胞/mL (细胞终浓度可随不同实验要求而不同)。

## 细胞制备 -方案B: 淋巴组织

通常机械性研磨淋巴组织可以让组织细胞变成单细胞悬液。

### 材料

- 60 × 15 mm组织培养皿
- 3mL注射器或毛玻璃玻片
- 细胞筛(尼龙网)
- 流式细胞染色液(货号00-4222)或其他缓冲液
- 15或50mL锥形离心管



用移液器使细胞流过细胞筛

### 实验步骤

**注:** 如果细胞要再培养, 采用无菌操作和不含叠氮化物的缓冲液进行所有步骤。

1. 将组织(脾、胸腺或淋巴结)采集到含10mL流式细胞染色缓冲液或其他缓冲液的细胞培养皿中。用3mL注射器的活塞施压, 制成单细胞悬液。或者在10mL流式细胞染色缓冲液中, 利用毛玻璃玻片的两端将组织捣碎。
2. 将细胞筛放在15或50mL离心管的上方。从细胞培养皿中转移细胞至离心管, 使细胞流过细胞筛, 滤掉细胞团块和碎片。
3. 在2-8°C和300-400 x g的条件下, 离心细胞悬液4-5分钟, 弃上清。
4. 用适当体积的流式细胞染色缓冲液或其他缓冲溶液重悬细胞, 并进行细胞计数和活性检测。
5. 按照第3步离心细胞并用适当体积的流式细胞染色液重悬细胞, 使最终浓度达到 $10^7$ 个细胞/mL(细胞终浓度可随不同实验要求而不同)。

## 细胞制备 - 方案C：非淋巴组织

### 材料

- 手术剪或解剖刀片
- 磷酸盐缓冲液 (PBS) 或其他适当的生理缓冲液
- 组织消化酶
- 60 x 15 mm细胞培养皿
- 3mL注射器
- 细胞筛 (尼龙网)
- 流式细胞染色缓冲液(货号00-4222)或选用其他缓冲液
- 15或50mL锥形离心管

### 实验步骤

**注:** 如果细胞要再培养, 采用无菌操作和不含叠氮化物的缓冲液进行所有步骤。

1. 使用手术剪或解剖刀片将组织切成2-4mm小块。
2. 在PBS中添加适量的消化酶, 根据不同酶的建议使用量, 在适当的温度孵育一定时间。
3. 轻轻吹打细胞, 并使其流过细胞筛滤掉团块和碎片。将细胞悬液收集在离心管内。
4. 在2-8°C和300-400 x g的条件下, 离心细胞悬液4-5分钟。弃上清。
5. 用PBS重悬细胞
6. 重复第4步
7. 用适量流式细胞染色缓冲液重悬细胞团块, 并进行细胞计数和活性检测。
8. 按照第4步离心细胞并用适量的流式细胞染色液或其他缓冲液重悬, 使最终浓度达到 $10^7$ 个细胞/mL (细胞终浓度可随不同实验要求而不同)。

## 细胞制备 - 方案D: 从全血中分离PBMC

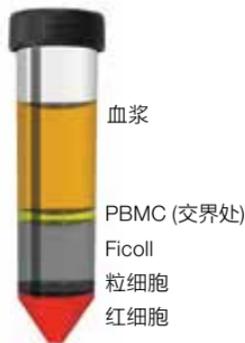
### 材料

- PBS
- Ficoll™ Paque或其他密度梯度分离液
- 流式细胞染色缓冲液(货号00-4222)或选用其他缓冲液
- 15或50mL锥形离心管

Ficoll离心之前的分层



Ficoll离心之后的分层



### 实验步骤

**注:** 如果细胞要再培养, 采用无菌操作和不含叠氮化物的缓冲液进行所有步骤。

1. 在离心管中用PBS将全血进行至少1: 1倍稀释。
2. 在离心管的底部加入与稀释前全血样本相同体积的Ficoll, 在Ficoll的上层缓缓加入稀释后的全血。
3. 400xg室温离心20分钟(离心过程中务必使“Brake”按键处于关闭状态。)
4. 采集PBS和Ficoll层交界处的外周血单核细胞(PBMC)到新试管内。
5. 在试管内加入适量PBS, 洗涤细胞。
6. 在2-8°C和300-400 x g的条件下, 离心细胞4-5分钟, 弃上清。
7. 使用适当体积流式细胞染色缓冲液或其他缓冲溶液重悬细胞, 并进行细胞计数和活性检测。
8. 按照第6步离心细胞并重悬于流式细胞染色缓冲液或其他缓冲液中, 使最终浓度达到 $10^7$ 个细胞/mL(细胞终浓度可随不同实验要求而不同)。

## 红细胞 (RBC) 裂解方案

### 引言

外周血或某些淋巴组织悬液用于流式分析或体外实验前, 必须去除红细胞 (RBC)。1X红细胞裂解液(货号00-4333)和10X裂解液 (多物种) (货号00-4300) 的配方特别适合裂解人外周血和小鼠组织 (例如脾) 单细胞悬液中的红细胞。裂解液中含有氯化铵, 能裂解红细胞但对白细胞影响很小。当使用人外周血进行流式分析时, 可以将红细胞裂解步骤整合到染色方案中。一步法固定/裂解液(10X) (货号00-5333) 将裂解红细胞和荧光抗体染色后的细胞固定整合在一起进行。荧光标记抗体在所有红细胞裂解液中都很稳定。



## 红细胞裂解 - 方案A: 使用1X或10X红细胞裂解液

1X和10X红细胞裂解液均适用于裂解抗凝全血(使用肝素或EDTA作为抗凝剂或用基于氯化铵的渗透压休克法处理的组织中的红细胞)。10X红细胞裂解液(多物种)专门适用于裂解外周血中的红细胞。经验证,它对人、小鼠、大鼠、犬和非人灵长类动物的全血均有效。1X红细胞裂解液适用于裂解人外周血,或小鼠脾脏、骨髓等造血组织中的红细胞。

### 材料

- 1X PBS
- 10X红细胞裂解液(多物种)(货号00-4300)或1X红细胞裂解液(货号00-4333)
- 50mL锥形离心管
- 流式细胞染色缓冲液(货号00-4222)或选用其他缓冲液
- 12 x 75 mm流式管
- 荧光标记一抗

### 注意事项

- 使用之前,必须在室温下使用试剂级水10倍稀释10X红细胞裂解液(多物种)
- 10X红细胞裂解液适用于肝素或EDTA抗凝全血的裂解。
- 少量残存红细胞一般不会影响后续细胞染色,而且可以在流式分析中通过设门排除红细胞。但是必要时也可以进行第二次红细胞裂解。

## 红细胞裂解液-方案A：使用1X或10X红细胞裂解液

### 实验步骤

#### A1. 先染抗体再裂外周血红细胞

**注意：** 抗体染色之前的红细胞裂解参见批量裂解方案A2。

1. 向流式管内加入全血样本。  
人使用100 $\mu$ L血样。  
小鼠使用50-100 $\mu$ L血样。  
大鼠使用50-100 $\mu$ L血样。  
犬使用100 $\mu$ L血样。  
非人灵长类动物使用100 $\mu$ L血样。
2. 加入染色用的抗体（容量不超过50 $\mu$ L），并充分混匀。参见第53页方案B “**流式细胞术细胞表面蛋白染色方案**”。
3. 室温避光孵育30分钟。
4. 加入2mL常温1X红细胞裂解液，然后涡旋或颠倒混匀。

5. 室温避光孵育。  
人血样孵育10-15分钟。  
小鼠血样孵育4-10分钟。  
大鼠血样孵育4-10分钟。  
犬血样孵育10-15分钟。  
非人灵长类动物血样孵育10-15分钟。

**注意：** 通过观察浑浊度评估红细胞裂解程度。当样本变得清澈时表示裂解完全。

6. 裂解之后，立即在室温和500xg下离心5分钟。弃上清。
7. （可选）重复第4-6步。

**注意：** 通常不需要执行第7步，因为少量残存红细胞不会影响后续实验，而且可以在流式分析中通过设门排除。

8. 用2mL流式细胞染色缓冲液重悬细胞，并按照第6步离心。
9. 弃上清，用适当体积的流式细胞染色缓冲液重悬细胞。
10. 上机检测。

## 红细胞裂解液-方案A：使用1X或10X红细胞裂解液

### A2. 裂解大量人全血标本

**注：**如果需要再培养细胞，下列步骤均需无菌操作。

1. 在每毫升人血样中加入10毫升1X红细胞裂解液。
2. 室温下孵育10-15分钟(不能超过15分钟)。

**注：**通过观察浑浊度评估红细胞裂解程度。当样本变得清澈时表示裂解完全。

3. 室温500xg离心5分钟。弃上清。
4. 用适量流式细胞染色缓冲液或其他缓冲液中重悬细胞。
5. 进行细胞计数和活性检测。
6. 根据需要进行细胞染色或培养。

### A3. 小鼠/大鼠脾脏或骨髓细胞裂解

**注意：**建议对小鼠和大鼠组织使用1X红细胞裂解液(货号00-4333)。

**注意：**如果需要再培养细胞，下列步骤均需无菌操作。

1. 采集组织并制备单细胞悬液。参见“**流式细胞术的细胞制备方案**”(第24页)。
2. 室温500xg离心5分钟，弃上清。
3. 用3-10mL 1X红细胞裂解液重悬细胞。
4. 室温孵育4-5分钟。
5. 加入20-30mL 1X PBS终止裂解过程。
6. 立即室温500xg离心5分钟，弃上清。
7. 用2mL流式细胞染色缓冲液或其他缓冲液重悬细胞，并按照第6步离心。弃上清。
8. 加入适量的流式细胞染色缓冲液或其他缓冲液重悬细胞。
9. 进行细胞计数和活性检测。
10. 根据需要进行细胞染色或细胞培养。

## 红细胞裂解 - 方案B: 使用一步法固定/裂解液

一步法固定/裂解液可以裂解红细胞的同时固定剩下的白细胞。它适用于抗体染色后的血样在分析前进行裂解和固定。而且, 它还适用于染抗体前裂解红细胞和固定细胞; 但需要注意的是必须确定所用的抗体可以识别相应抗原上的固定表位。

### 材料

- 1X PBS
- 一步法固定/裂解液 (10X) (货号00-5333)
- 50mL锥形离心管
- 流式细胞染色缓冲液(货号 00-4222)
- 12 x 75 mm流式管
- 荧光标记一抗

### 注意事项

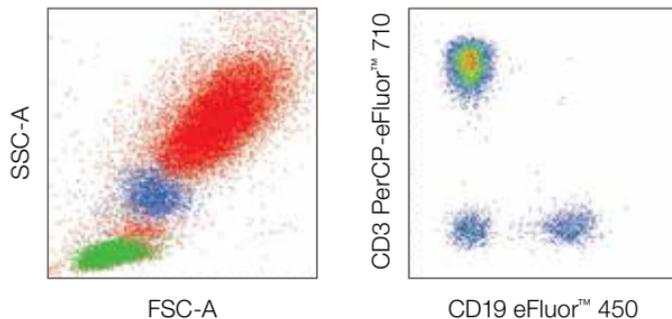
- 使用之前, 必须用室温、分析级纯水10倍稀释一步法固定/裂解液
- 一步法固定/裂解液适用于肝素或EDTA抗凝的全血。

## 红细胞裂解 - 方案B: 使用一步法固定/裂解液

### 实验步骤

1. 向100 $\mu$ L全血中加入适量表面染色所需的流式抗体, 并充分混匀。参见“**流式细胞术细胞表面蛋白染色方案**”(第53页方案B)。
2. 室温避光孵育30分钟。
3. 加入2mL常温的1X一步法固定/裂解液, 然后轻轻颠倒混匀。
4. 室温避光孵育15-60分钟。
5. (可选) 2-8 $^{\circ}$ C避光条件下, 样本可以在一步法固定/裂解液中最多保存3天。

**注:** 在该贮存条件下, eBioscience™ 偶联染料标记抗体同样可保持稳定。但为了得到最佳的补偿结果, 应该将补偿调节用的单染管细胞也存放在相同的条件下[如上所述]。



### 固定和裂解一步完成

使用抗人CD45 FITC (货号11-9459), 抗人CD3 PerCP-eFluor™ 710 (货号46-0037)和抗人CD19 eFluor™ 450 (货号48-0199)染正常人外周血细胞, 然后在新稀释的一步法固定/裂解液中室温孵育15分钟。离心细胞后利用流式染色缓冲液洗涤细胞, 最后上机分析。所有活细胞的FSC/SSC点图中可见CD45+粒细胞(红色)、单核细胞(蓝色)和淋巴细胞(绿色), 分析CD45+淋巴细胞的CD3和CD19的表达情况(右图)。

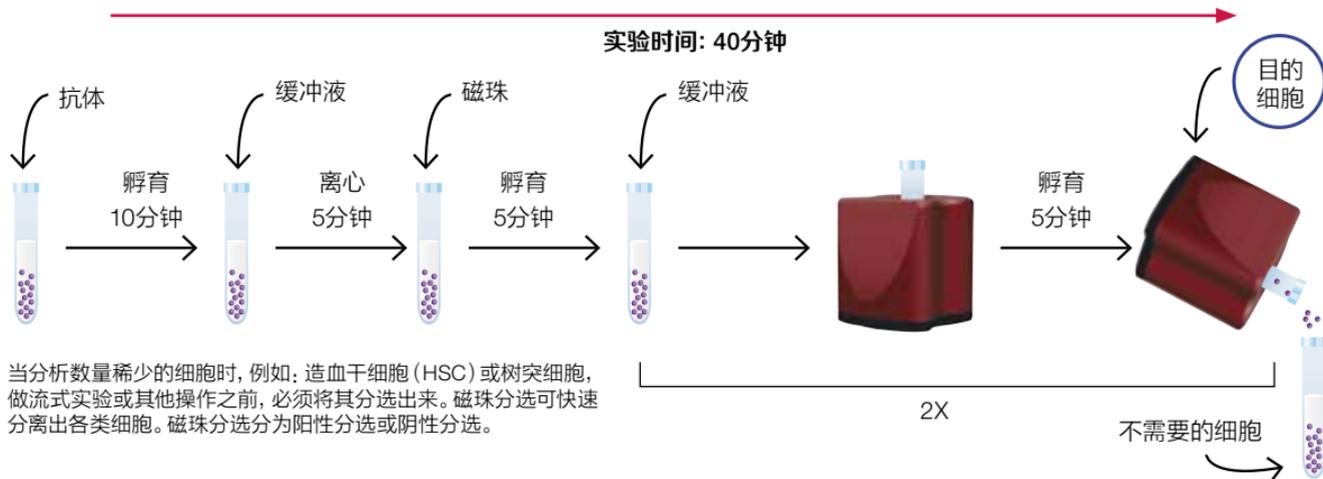
## 红细胞裂解 -方案B：使用一步法固定/裂解液

6. 室温500xg下离心5分钟, 弃上清。
7. [可选]使用2mL 1X破膜液洗涤样本两次, 然后加入荧光抗体进行细胞内抗原染色。详细说明参见“**细胞内蛋白染色, 方案A**” (第64页)。
8. 加入2mL流式细胞染色缓冲液, 并按照第6步离心。弃上清。
9. 用200 $\mu$ L流式细胞染色缓冲液重悬细胞。
10. 上机分析样本。

## 磁珠分选- 方案A: MagniSort™阳性分选

### 引言

下述方案是MagniSort™阳性分选试剂盒的通用操作指南。具体请参见试剂盒内的说明书。在阳性分选中，待分选的细胞首先与生物素标记的抗体结合，然后被链酶亲和素包被的磁珠捕获。将细胞放入MagniSort™磁座后，阳性细胞被磁场吸住，而阴性细胞仍游离在溶液中，可被弃掉。每个试剂盒中的生物素化抗体和磁珠预先已滴定好最适浓度，为即用型试剂。



当分析数量稀少的细胞时，例如：造血干细胞 (HSC) 或树突细胞，做流式实验或其他操作之前，必须将其分选出来。磁珠分选可快速分离出各类细胞。磁珠分选分为阳性分选或阴性分选。

## 磁珠分选- 方案A: MagniSort™阳性分选

### 注意事项

注: MagniSort™ 5mL磁座可产生强磁场。应远离心脏起搏器、信用卡、磁性身份卡、手表、计算机显示器、硬盘等物品, 以免损坏。

### 细胞制备

1. 在未特别说明的情况下, MagniSort™阳性分选试剂盒已优化, 适用于小鼠二级淋巴组织或正常人PBMC。
2. 用于小鼠细胞时, 建议用40μm的尼龙细胞筛清除碎屑, 以使试剂盒发挥出最佳效果。
3. 正常人PBMC的制备, 参见“细胞制备-方案D: 从全血中提取PBMC”(第28页)。为使MagniSort™试剂盒发挥最佳性能, 建议彻底洗涤白膜层, 去除血小板。
4. 向缓冲液中加入EDTA减少细胞聚集。

### 后续用于无菌培养

1. MagniSort™阳性分选抗体和阳性分选磁珠中含有少量叠氮化钠作为防腐剂。当使用不含叠氮化钠的无菌缓冲液时, 它不会影响细胞功能。需要根据测试判断在特定实验中的性能。
2. 分选无菌细胞时应该在超净工作台中进行, 并使用带盖的聚苯乙烯无菌试管和无菌缓冲液。

### 提供的材料

- MagniSort™阳性分选抗体, 200次试验, 20μL/次试验。2-8°C贮存。
- MagniSort™阳性分选磁珠, 4mL。2-8°C贮存。

### 所需其他材料

- 细胞分选推荐使用的缓冲液: 添加3%胎牛血清(FBS)和10mM EDTA的PBS或Hank平衡盐溶液(HBSS)。2-8°C贮存。
- MagniSort™磁座, 5mL。
- 12 x 75 mm流式管(5 mL, BD Falcon™, 货号352008或类似产品)。
- 15mL离心管(BD Falcon™, 货号352099或类似产品)

## 磁珠分选- 方案A: MagniSort™阳性分选

### 实验步骤

1. 用适当的细胞分离液, 制备浓度为 $1 \times 10^7$ 细胞/100 $\mu$ L ( $1 \times 10^8$ /mL) 的淋巴细胞悬液。

**注:** 细胞必须制成单细胞悬液。实验前需要检查样本, 必要时用涡旋法或移液器去除细胞团块。

2. 将所需数量的细胞 (不能超过 $2 \times 10^8$ 个细胞) 放入12 x 75 mm的5mL试管中。
3. 每100 $\mu$ L细胞中加入20 $\mu$ L MagniSort™阳性分选抗体。涡旋5次混匀。室温孵育10分钟。
4. 加入细胞分离液洗涤细胞, 使其总体积达到4mL, 在300xg下离心5分钟。
5. 弃上清, 然后用细胞分离液完全重悬细胞至最初的体积。

**注:** 细胞必须制成单细胞悬液, 实验前需要检查样本, 必要时用涡旋或移液器去除细胞团块。

6. 每100 $\mu$ L细胞中加入20 $\mu$ L MagniSort™阳性分选磁珠。涡旋5次混匀。室温孵育10分钟。

**注:** 为确保最佳性能, 将MagniSort™阳性分选磁珠加入细胞之前必须充分混匀。将设定为1mL的Pipetman™ P1000移液器上下吹打5次, 或者采用涡旋的方式完全重悬磁珠。

7. 用细胞分离液将体积加至2.5mL。将设定为1mL的Pipetman™ P1000移液器上下吹打3次, 使其混匀。不能涡旋。
8. 将试管完全插入磁座中间的孔底, 室温孵育5分钟。
9. 拿起磁座将试管内的上清液倒入废液容器内; 这些是不需要 (未结合) 的细胞。将试管倒置1秒钟, 然后回正。

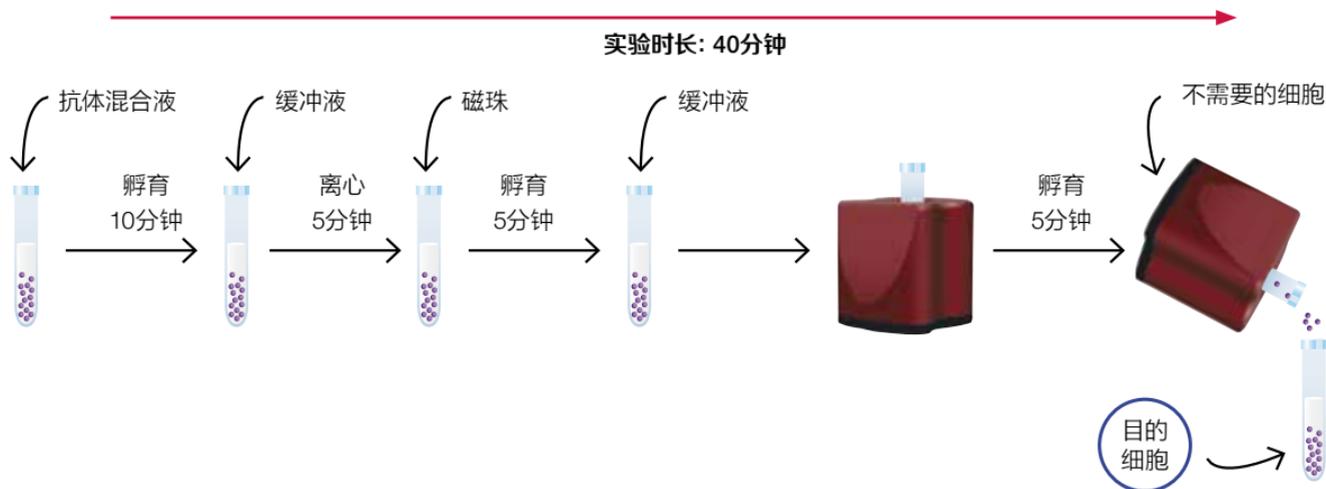
**注:** 切勿吸干或摇晃倒置后的试管, 否则会降低回收率。如果需要也可以收集起结合细胞。

10. 从磁座中取出试管并重复7-9步两次, 总共洗涤细胞3次。
11. 从磁座中取出含目标细胞的试管, 加入1mL细胞分离液。沿着试管侧壁加入缓冲液, 洗涤试管侧壁。此时, 试管内就是分选的阳性细胞, 备用。

## 磁珠分选 -方案B: MagniSort™ 阴性分选

### 简介

以下是MagniSort™阴选试剂盒的通用操作指南，该试剂盒适用于细胞进行阴性分选。具体请参见每个试剂盒内的说明书。在阴性分选中，不需要的细胞与生物素化抗体混合液结合，然后加入链霉亲和素包被的磁珠。将细胞放入MagniSort™磁座后，不需要的细胞被磁场吸住，而需要的细胞游离在溶液中，将其倒出后即可使用。每个试剂盒中的生物素化抗体和磁珠已预先滴定好最适浓度，为即用型试剂。



## 磁珠分选 -方案B: MagniSort™阴性分选

### 注意事项

**注意:** MagniSort™ 5mL磁座可产生强磁场。应远离心脏起搏器、信用卡、磁性身份卡、手表、计算机显示器、硬盘等物品, 以免损坏。

### 细胞制备

1. 在未特别指明的情况下, MagniSort™ 阴选试剂盒已经过优化, 专门适用于小鼠二级淋巴组织或正常人PBMC。
2. 用于小鼠细胞时, 建议用40 $\mu$ m的尼龙细胞筛清除碎屑, 以使试剂盒发挥出最佳效果。
3. 正常人PBMC的制备, 参见“细胞制备-方案D: 从全血中提取PBMC”(第28页)。为使MagniSort™试剂盒发挥最佳性能, 建议彻底洗涤白膜层, 去除血小板。
4. 缓冲液中加入EDTA减少细胞聚集。

### 后续用于无菌培养

1. MagniSort™阴选抗体混合液和阴性分选磁珠中含有少量叠氮化钠作为防腐剂。当使用不含叠氮化钠的无菌缓冲液时, 它不会影响细胞功能。需要根据测试判断在特定实验中的性能。
2. 分选无菌细胞时应该在超净工作台中进行, 并使用带盖的聚苯乙烯无菌试管和无菌缓冲液。

## 磁珠分选 -方案B: MagniSort™ 阴性分选

### 提供的材料

- MagniSort™ 阴选抗体混合液, 200次实验, 20 $\mu$ L/次试验。2-8°C 贮存。
- MagniSort™ 阴性分选磁珠, 4mL。2-8°C 贮存。

### 所需其他材料

- 细胞分选推荐使用的缓冲液: PBS或添加3%FBS和10mM EDTA的HBSS。2-8°C 贮存。
- MagniSort™ 磁座, 5mL
- 12 x 75 mm流式管(5 mL, BD Falcon™, 货号352008或类似产品)

### 实验步骤

1. 用适当的细胞分离液, 制备浓度为 $1 \times 10^7$ 细胞/100 $\mu$ L ( $1 \times 10^8$ /mL) 的单细胞悬液。

**注:** 细胞必须制成单细胞悬液。实验前需要检查样本, 必要时用涡旋法或移液器去除细胞团块。

2. 将所需数量的细胞 (不能超过 $2 \times 10^8$ 个细胞) 放入12 x 75 mm 的5mL试管中。
3. 每100 $\mu$ L细胞中加入20 $\mu$ L MagniSort™ 阴选抗体混合液。涡旋5次混匀。室温孵育10分钟。
4. 用细胞分离液洗涤细胞, 使其总体积达到4mL, 300xg离心5分钟。
5. 弃上清, 然后用细胞分离液完全重悬细胞至最初的体积。

**注:** 细胞必须制成单细胞悬液。实验前需要检查样本, 必要时用涡旋法或移液器去除细胞团块。

## 磁珠分选 -方案B: MagniSort™阴性分选

6. 向每100 $\mu$ L细胞中加入20 $\mu$ L MagniSort™阴性分选磁珠。涡旋5次混匀。室温孵育5分钟。

**注:** 为确保最佳性能, 将MagniSort™阴性分选磁珠加入细胞之前必须充分混匀。将设定为1mL的Pipetman™ P1000移液器上下吹打5次, 完全重悬磁珠, 不能涡旋。

7. 用细胞分离液将体积加至2.5mL。将设定为1mL的Pipetman™ P1000移液器上下吹打3次, 使其混匀。不能涡旋。

8. 将试管插入磁座中间的孔底, 室温孵育5分钟。

9. 拿起磁座以连续的动作将试管内的上清液倒入一支新的12x75 mm 5mL试管中并将磁座内的试管倒置1秒钟, 然后回正。

**注:** 切勿吸干或摇晃倒置后的试管, 否则会降低未结合细胞的纯度。

10. 将磁座中的试管丢弃。

11. 此时, 新5mL 12 x 75 mm试管中的阴性细胞即为分选后的目的细胞, 备用。

## 补偿调节

- 引言 . . . . . 44
- 补偿微球使用方案 . . . . . 45

## 补偿调节

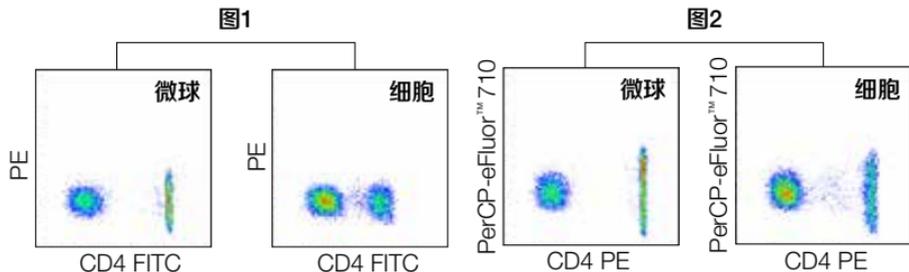
### 引言

OneComp eBeads™和UltraComp eBeads™可以与小鼠、大鼠和仓鼠来源的抗体结合，且不依赖于免疫球蛋白的轻链。

每滴微球中含有两种群体，一群为可以捕获小鼠、大鼠和仓鼠抗体的阳性微球，以及不与抗体反应的阴性微球。将荧光标记抗体加入微球后，流式图中可以看到阳性和阴性两个峰，双峰分布可作为多色流式细胞检测中的单色补偿对照。

OneComp eBeads™适用于所有被蓝色(488 nm)、绿色(532 nm)、黄绿色(561 nm)和红色(633–640 nm)激光激发的荧光染料。该产品也适用于eFluor™ 450，但不适合被紫色(405nm)激光激发的其他荧光染料。

UltraComp eBeads™适用于所有被蓝色(488 nm)、绿色(532 nm)、黄绿色(561 nm)、红色(633–640 nm)、紫外线(355nm)或紫色(405nm)激光激发的荧光染料。



#### 使用UltraComp eBeads™设置补偿

图1：利用UltraComp eBeads™（左图）或细胞（右图）补偿CD4 FITC溢漏在PE信号通道中的图形。

图2：利用UltraComp eBeads™（左图）或细胞（右图）补偿CD4 PE溢漏在PerCP-eFluor™710信号通道中的图形。

## 补偿微球的使用方案

### 材料

- 补偿微球: OneComp eBeads™ (货号 01-1111) 或UltraComp eBeads™(货号01-2222)
- 未染色细胞
- 一级抗体
- 流式细胞染色缓冲液(货号00-4222)
- 12 x 75 mm流式管

### 实验步骤

#### 第一步: 制备单色补偿对照

1. 为实验中所用每种荧光染料的试管做好标记。
2. 颠倒混匀至少10次, 或者涡旋混匀微球。
3. 每管加入1滴OneComp或UltraComp eBeads™。
4. 每管加入一次实验用量或更少的荧光标记抗体混匀。

**注:** UltraComp eBeads™与含有PBS或HBSS、牛血清(BSA)或FBS等蛋白质、叠氮化钠的标准染色缓冲液相容。不应使用其他添加剂。如需了解更多信息, 请您与技术支持部门联系。

**注:** 一次试验用量的定义是, 能够染色最终体积100 $\mu$ L细胞样本的抗体量( $\mu$ g)。如果阴性微球群体背景值较高, 可减少抗体用量。在此类情况下, 推荐的用量为0.125 $\mu$ g或以下。由于抗体与阳性微球的结合与抗体特异性无关, 因此无需使用最佳浓度的抗体。对于大多数抗体而言, 单色补偿对照管加入的抗体用量是0.03-1.0 $\mu$ g。

## 补偿微球的使用方案

5. 通过轻弹、颠倒或涡旋的方式混匀。
6. 2-8°C避光孵育15-30分钟。
7. 每管加入2mL流式细胞染色缓冲液, 400-600 x g离心3-5分钟。
8. 弃上清, 每管加入0.2-0.4 mL流式细胞染色缓冲液。
9. 轻弹或涡旋混匀, 然后上机检测。
4. 依次获取每管单染色微球样本进行补偿调节, 储存补偿对照的文件。
5. 重新调节细胞样本的FSC/SSC, 不要调节荧光通道的电压值。
6. 获取并记录实验样本。

### 第二步: 补偿设置的基本原则

1. 在流式细胞仪上检测未染色的细胞, 设定合适的前向散射 (FSC) 和侧向散射 (SSC) 设定值和荧光探测器电压 (光电倍增管, 或PMT)。
2. 选择一管微球样本上机, 重新调整FSC和SSC电压, 以便在FSC/SSC点图中可以看到微球 (可以用未染色微球)。
3. 检测每管单染色微球样本, 确保阳性峰值在仪器的检测范围内。如果微球的阳性峰超出仪器的检测范围, 应降低PMT电压 (尽量最小)。在检查完所有单染色微球之前不必记录任何数据。

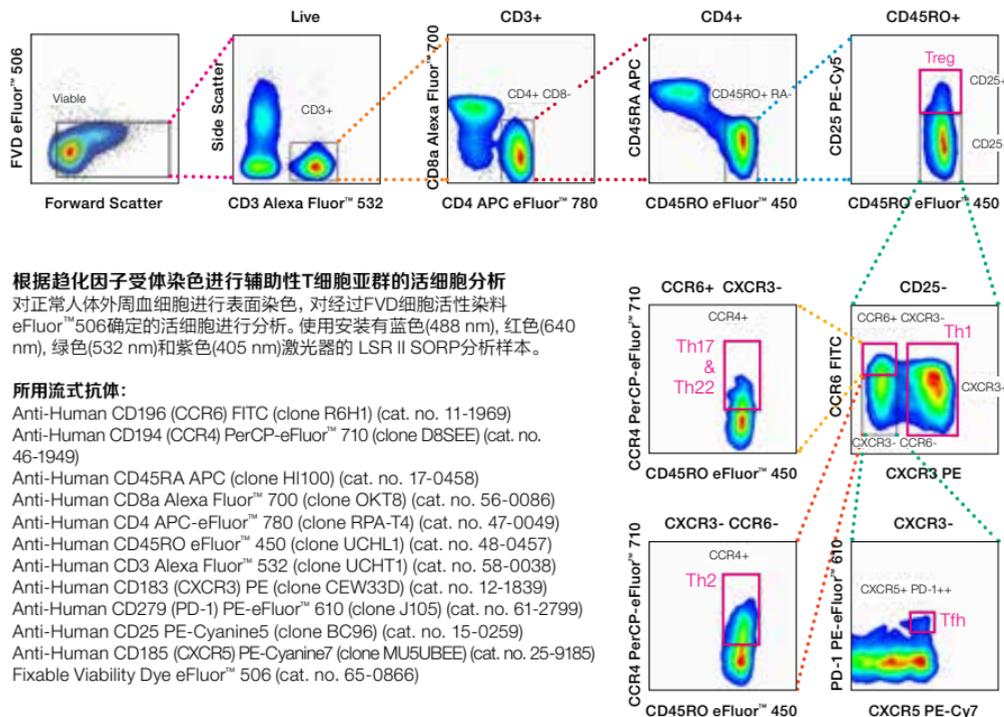
## 细胞表面蛋白染色

- 流式细胞术中的细胞表面蛋白染色 . . . . . 48
  - 方案A: 单细胞悬液样本 . . . . . 51
  - 方案B: 裂解人全血 . . . . . 53

## 流式细胞术中的细胞表面蛋白染色

### 引言

利用荧光结合抗体标记细胞表面标记物，并进行流式细胞分析后，可以根据细胞谱系和发育阶段确定细胞亚群及其功能。这些表面标记物具有不同的形式和功能，包括可溶性和细胞结合位点的受体，离子通道、糖蛋白、磷脂等。例如，CD4就是一种辅助性T细胞的表面标记物。我们可以根据其他趋化因子受体和分化抗原簇（CD）的表达进一步区分出不同的细胞亚群。被抗体染色的活细胞可以根据其独特的表型进行分选，用于其他实验。



## 细胞表面染色操作流程概述

- 制备单细胞悬液
- [可选]阻断Fc受体 (10-20分钟)
- 加入抗体, 2-8°C孵育 (30分钟)
- 用流式细胞染色缓冲液洗涤 (1-2x5分钟)
- 如非荧光染料直标抗体加入二级试剂, 2-8°C孵育 (30分钟)
- 用流式细胞染色缓冲液洗涤 (1-2x5分钟)
- [可选]细胞活性染料染色细胞 (20-30分钟)
- [可选]使用1X红细胞裂解液或1X一步法固定/裂解液裂解红细胞 (10-12分钟)
- 用流式细胞染色缓冲液重悬细胞
- 利用流式细胞仪分析细胞



## 一般注意事项

1. 为使荧光结合抗体性能达到最佳, 应将其2-8°C避光保存, 禁止冷冻。
2. 使用之前应快速离心抗体瓶, 确保抗体在管底部, 不建议涡旋抗体瓶。
3. 除抗体说明中明确指出以外, 全部染色均在冰块或2-8°C下完成, 且尽量避光。
4. 如果用荧光结合抗体染色后需要短暂贮藏样本, 可以将样本贮藏在IC固定液(货号 00-8222)中。方法是将100 $\mu$ L样本加入100ul IC固定液或者2mL一步法固定/裂解液(货号 00-5333). 样本可以在这两种溶液中2-8°C避光保存3天。

**注:** 当使用IC固定液 (货号00-8222)或一步法固定/裂解液(货号00-5333)贮藏样本时, 其对偶联染料 (如APC-eFluor 780或PE-Cy7) 的亮度或能量共振转移 (FRET) 的效率以及荧光补偿的影响很小。固定液的质量差别可影响荧光染料亮度或FRET效率。尽管我们能够得出固定后荧光染料性能的一些普遍规律, 但固定可能对某些克隆号的抗体染色产生一定影响。

**注:** 建议在固定样本前用细胞活性染料 (FVD) 染色, 这样可以在流式细胞分析的过程中为活细胞设门。

## 细胞表面蛋白染色 - 方案A：单细胞悬液样本

### 材料

- 12 x 75 mm流式管, 或96孔U形或V形底微孔板
- 一抗(直标或纯化抗体)
- 二级试剂(用于间接染色)
- 纯化抗小鼠CD16/CD32(货号 14-0161)或纯化人Fc受体结合抑制剂(货号14-9161)
- 流式细胞染色缓冲液(货号00-4222)
- [可选] 细胞活性染料:
  - 7-AAD活性染料(货号00-6993)
  - 碘化丙啶染料(货号00-6990),
  - 可固定的活性染料(FVD) eFluor™ 455UV (货号65-0868), eFluor™ 450 (货号65-0863), eFluor™ 506 (货号65-0866), eFluor™ 520 (货号65-0867), eFluor™ 660 (货号65-0864), eFluor™ 780 (货号65-0865)

### 实验步骤

**注:** 抗体结合动力学与温度有关。在冰上染色所需孵育时间较长。而且, 一些抗体需要用到非标准方式孵育会在说明书上描述。

1. 制备单细胞悬液。参见“流式细胞技术的细胞制备方案”(第24页)。
2. [可选]阻止Fc受体介导的非特异性结合:
  - 小鼠细胞: 染色前, 每100 $\mu$ L细胞标本加入0.5-1 $\mu$ g抗小鼠CD16/CD32纯化抗体, 在2-25°C温度下预先孵育细胞10-20分钟。
  - 人细胞: 染色前, 每100 $\mu$ L细胞标本加入20 $\mu$ L人Fc受体结合抑制剂, 在2-25°C温度下预先孵育细胞10-20分钟。
3. 每管或每孔加入50 $\mu$ L细胞悬液(10<sup>5</sup>-10<sup>8</sup>细胞)。
4. 将每种抗体按照推荐使用量混合于流式染色缓冲液中, 使染色液的终体积达到100 $\mu$ L(例如, 50 $\mu$ L细胞加入50 $\mu$ L抗体混合液), 脉冲式轻轻涡旋以混合均匀。

### 荧光直标抗体

## 细胞表面蛋白染色 - 方案A：单细胞悬液样本

**注：**纯化或生物素结合的一级抗体直接至第8步。

5. 2-8°C或冰上避光孵育至少30分钟。
6. 加入流式细胞染色缓冲液洗涤细胞。  
每支流式管加入2mL，或微量孔板的每个微孔加入200µL。  
室温400-600xg离心5分钟。弃上清。
7. 重复第6步。

**注：**如果所有抗体为荧光直标，则直接至第14步。

### 纯化或生物素化抗体

8. 在2-8°C或冰上孵育60分钟。
9. 加入流式细胞染色缓冲液洗涤细胞。  
每支流式管加入2mL，或微量孔板的每个微孔加入200µL。  
室温400-600xg离心5分钟，弃上清。
10. 重复第9步。

11. 使用100µL流式细胞染色缓冲液稀释适量的荧光染料标记二级抗体，然后加入细胞。2-8°C或冰上避光孵育至少30分钟。

12. 加入流式细胞染色缓冲液洗涤细胞。每管加入2mL，或微量孔板的每个微孔加入200µL。室温400-600xg离心5分钟，弃上清。
13. 重复第12步。
14. [可选]依照相应的“细胞活性染料方案”（第94页），对细胞染色以区分死活细胞。
15. [可选]对于分析之前贮藏的样本，可以100µL流式细胞染色缓冲液中重悬细胞，加入100µLIC固定液或2mL一步法固定/裂解液。

**注：**细胞可以在2-8°C避光保存3天。

16. 在适量的流式细胞染色缓冲液中重悬细胞。
17. 使用流式细胞仪分析样本。

## 细胞表面蛋白染色 - 方案B：人全血裂解样本

利用荧光结合抗体染色全血之后，10X红细胞裂解液（多物种）或一步法固定/裂解液（10X）均能用来裂解红细胞。另外，一步法固定/裂解液（10X）可以在裂解红细胞的同时固定白细胞。如果在染色前用一步法固定/裂解液裂解全血细胞，则确定染色的抗体能识别出感兴趣抗原上的被固定过的表位。

关于固定/破膜对不同抗体克隆的影响，参见“固定/破膜后的抗体克隆表现”表（第60页）。

### 材料

- 10X红细胞裂解液（多物种）（货号 00-4300）或一步法固定/裂解液（10X）（货号00-5333）

**注：**使用之前，必须将10X红细胞裂解液（多物种）和一步法固定/裂解液（10X）稀释为1X。方法是取1体积的缓冲液，加入9体积室温的试剂级水。

- 12 x 75 mm流式管
- 一级抗体（荧光直接结合或纯化）
- 二级试剂（用于间接染色）
- 纯化的人Fc受体结合抑制剂（货号14-9161）
- 流式细胞染色缓冲液（货号 00-4222）
- [可选]细胞活性染料：
  - 7-AAD活性染料（货号00-6993）
  - 碘化丙啶染料（货号00-6990）
  - [可选]细胞活性染料（FVD）eFluor™ 455UV（货号65-0868），eFluor™ 450（货号65-0863），eFluor™ 506（货号. 65-0866），eFluor™ 520（货号65-0867），eFluor™ 660（货号65-0864），eFluor™ 780（货号65-0865）

## 细胞表面蛋白染色 - 方案B：人全血裂解样本

### 实验步骤

**注：**抗体结合动力学与温度有关。在冰上染色所需孵育时间较长。而且，一些抗体需要用到非标准方式孵育会在说明书上描述。

1. 每管加入100 $\mu$ L全血。
2. [可选]每100 $\mu$ L全血加入20 $\mu$ L纯化的人Fc受体结合抑制剂，阻断非特异性Fc受体介导的非特异性结合。2-8 $^{\circ}$ C室温孵育10-20分钟。
3. 将每种抗体按照推荐使用量混合于流式染色缓冲液中，使最终染料的体积为50  $\mu$ L，并加入细胞。脉冲式轻轻地涡旋混匀。
4. 室温避光孵育20-30分钟。

**注：**如果所有抗体都是荧光直标抗体，则直接至第7步。

### 纯化或生物素化抗体

5. 加入2mL流式细胞染色缓冲液洗涤细胞。室温400-600xg离心5分钟。弃上清。
6. 使用100 $\mu$ L流式细胞染色缓冲液稀释适量的荧光标记二级试剂，然后加入细胞。2-8 $^{\circ}$ C或冰上避光孵育15-30分钟。
7. 不要洗涤细胞，加入2mL新制备的1X红细胞裂解液并轻轻涡旋混匀。室温下孵育10-20分钟。注意避光。

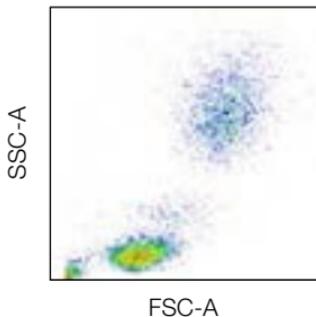
**注：**如果使用10X红细胞裂解液（多物种）(货号 00-4300)，孵育时间不能超过20分钟。

8. 室温400-600xg离心5分钟，弃上清。
9. 加入2mL流式细胞染色缓冲液，室温400-600xg离心5分钟。弃上清。
10. 重复第9步。
11. [可选]对于用10X红细胞裂解液裂解的细胞，依照相应的“**细胞活性染料方案**”（第96页），染色细胞以区分死活细胞。

## 细胞表面蛋白染色 - 方案B：人全血裂解样本

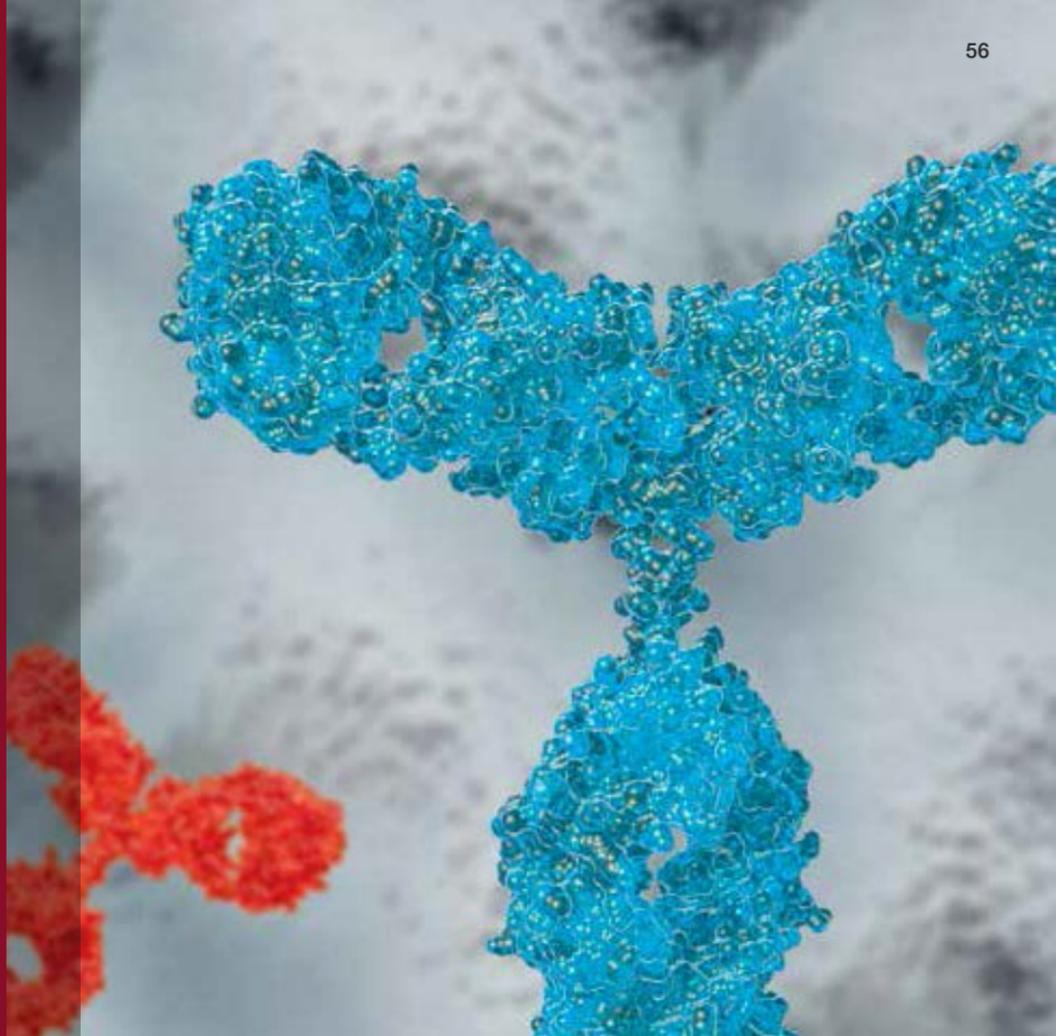
**注：**活性染料（例如：碘化丙啶或7-AAD）不能用于使用一步法固定/裂解液裂解的细胞，因为固定会导致细胞破膜。细胞活性染料（FVD）可以在使用一步法固定/裂解液之前对全血细胞染色；更多信息请参见第98页“**活性染料染色方案C**”。

12. 在适量的流式细胞染色缓冲液中重悬染色的细胞。
13. 使用流式细胞仪分析样本。



### 红细胞裂解

使用10X红细胞裂解液(货号 00-4300)裂解正常人外周血细胞。



## 细胞内蛋白染色

- 细胞内蛋白染色 - 考虑因素 . . . . . 58
  - 蛋白转运抑制剂 . . . . . 58
  - 固定和破膜 . . . . . 58
  - 固定/破膜后抗体克隆的性能 . . . . . 59
- 细胞内蛋白染色方案 . . . . . 63
  - 方案A: 胞浆蛋白质两步法实验方案 . . . . . 64
  - 方案B: 细胞核蛋白一步法实验方案 . . . . . 66
  - 方案C: 固定/甲醇两步法实验方案 . . . . . 69
- 细胞内染色快速指南 . . . . . 73
- 流式细胞术的BrdU染色方案 . . . . . 77

## 细胞内蛋白的染色 - 考虑因素

### 蛋白转运抑制剂

我们可利用蛋白质转运抑制剂阻断细胞因子或趋化因子等蛋白质分泌到细胞外, 将其保留在细胞内, 然后通过流式细胞术分析此类分泌型蛋白。最常用的抑制剂是能阻止内质网蛋白质转运的 Brefeldin A(货号00-4506), 以及能阻止高尔基体内蛋白质转运的莫能菌素 Monensin (货号00-4505)。这两者可联合使用(例如: 蛋白转运抑制剂混合试剂, 货号00-4980)。也可以与其他刺激物联合使用, 例如: 佛波醇12-十四酸酯13-乙酸酯(PMA)和离子霉素 ionomycin(比如: 细胞刺激混合试剂加蛋白质转运抑制剂, 货号00-4975)。如“细胞内染色快速指南”(第73-75页)所述, 不同的细胞因子和趋化因子可以对不同的蛋白质转运抑制剂产生更有效的反应。细胞长期暴露在蛋白质转运抑制剂中会发生死亡, 应根据待测细胞和目的蛋白进行优化。

### 固定和破膜

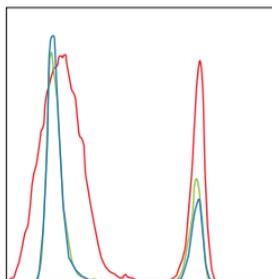
固定是在特定条件和时间段内, 保留或稳定生物物质的过程。固定也用来中和生物毒性。固定强度和时间必须优化, 使抗原和细胞结构得以保留, 尽量减少对抗原表位的损伤。如果目的抗原是细胞内蛋白, 则需要进行破膜处理, 给细胞膜打孔, 以便抗体和其他试剂能进到细胞内与目的蛋白结合。如上所述, 某些目标可能位于细胞内, 使用能阻止分泌的化学物质, 能让我们利用流式细胞术对分泌蛋白进行分析。固定和破膜条件必须根据目标蛋白在细胞内的位置进行优化。下一章将描述一些固定与破膜优化方案, 以满足不同研究的需要。

## 固定/破膜后抗体克隆的性能

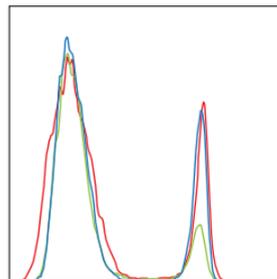
固定后细胞表面蛋白质的染色情况，取决于固定过程对蛋白质表位的影响。

“**固定/破膜后抗体克隆的性能**”（第60页）中描述了利用细胞内固定&破膜试剂盒(货号88-8824)或IC固定液(货号00-8222)固定再经过甲醇处理之后，不同克隆的性能。应注意，胞内蛋白必需固定破膜后才可以被抗体染色。

化学固定剂的主要分类		
分类	功能	举例
乙醛	形成将可溶性蛋白质固定在细胞骨架上的共价交联，以保护蛋白质的二级结构；保护蛋白质的大量三级结构。	多聚甲醛
乙醇	通过破坏其疏水作用引起蛋白质变性和沉淀，从而保持二级和三级结构。	甲醇 乙醇 丙酮
氧化剂	与各种侧链反应，形成共价交联；导致广泛变性。	重铬酸钾 过锰酸钾



PE-Cy7



APC-eFluor™ 780

### 染料保存在固定液中

偶联染料在eBioscience固定液中很稳定，与新染色后分析的细胞相比，在补偿/FRET效率上没有差别。上图显示，不同偶联染料标记的抗小鼠CD4抗体（RM4-5）分别在一步法固定/裂解液（货号00-5333）和IC固定液（货号00-8222）中保存3天与活细胞染色的结果。

### ■ 活细胞

### ■ IC固定液固定3天

(100  $\mu$ L细胞+ 100  $\mu$ L IC固定液)

### ■ 一步法固定/裂解液固定3天

(100  $\mu$ L细胞 + 2 ml固定/裂解液)

## 固定/破膜后抗体克隆的性能

抗原	克隆	活细胞 (IC 固定前) <sup>1</sup>	IC固定和破膜洗涤后 <sup>1</sup>	IC固定/甲醇处理后 <sup>2</sup>
<b>人</b>				
CD3	OKT3	+++	++	+
	UCHT1	+++	+++	+++
	SK7	+++	++*	+++
CD4	OKT4	+++	+*	+/-
	RPA-T4	+++	+++*	+
	SK3	+++	+++	+
CD5	UCHT2	+++	+++	+++
CD8	OKT8	+++	+/-	-
	RPA-T8	+++	+++	+/-
	SK1	+++	+++*	+/-
CD8b	SID8BEE	+++	++	++
CD11a	HI11	+++	+++	+
CD11b	CBRM1/5	+	-	+++
	ICRF44	++	-	++
CD11c	3.9	++	+*	++
CD14	61D3	+++	+++*	++
CD19	HIB19	+++	++*	+/-
CD20	2H7	+++	+++	-
CD25	BC96	+	-	+/-
CD27	O323	+++	+*	+
CD31	WM59	+++	++*	+++
CD33	p67.6	+++	+++*	+++
CD38	HB7	++	-	++

相对染色: (+++)最亮, (++) 较亮, (+) 亮, (+/-) 弱, (-) 阴性

抗原	克隆	活细胞 (IC 固定前) <sup>1</sup>	IC固定和破膜洗涤后 <sup>1</sup>	IC固定/甲醇处理后 <sup>2</sup>
<b>人</b>				
CD38	HIT2	++	-	++
CD40	5C3	++	-	++
CD44	IM7	+++	+++	+++
CD45	2D1	+++	+++	+++
	HI30	+++	+++	+++
CD45RA	HI100	+++	+++	+++
CD45RO	UCHL1	+++	+++	++
CD56	MEM-188	+	-	+/-
	CB56	+	-	+/-
	CMSSB	++	+/-*	-
CD57	TB01	++	++	++
CD62L	DREG-56	++	-	++
CD69	FN50	+++	++	++
CD80	2D10.4	+	-	+
CD83	HB15e	++	++	++
CD86	IT2.2	+	+*	+
CD94	HP-3D9	++	++	++
CD95	DX2	+	-	+
CD127	RDR5	++	+*	++
CD161	HP-3G10	++	++*	+

## 固定破膜后抗体克隆的性能

抗原	克隆	活细胞 (IC 固定前) <sup>1</sup>	IC固定和破膜洗涤后 <sup>1</sup>	IC固定/甲醇处理后 <sup>2</sup>
<b>小鼠</b>				
CD3	145-2C11	++	+	+/-
	500A2	+++	+++*	+++
	17A2	+++	+++	+++
CD4	GK1.5	+++	++*	+++
	RM4-5	+++	+++*	+++
CD8	53-6.7	+++	++	++
CD11b	M1/70	++	++	++
CD11c	N418	+++	+++	++
CD19	1D3	+++	++*	-
	MB19-1	++	-	-
CD24	M1/69	+++	+++	++
CD25	PC61.5	+	-	+
	3C7	++	-	+
	7D4	++	++	+
CD39	24DMS1	+	-	++
CD44	IM7	++	++*	++
CD45	30-F11	+++	+++	+++
CD45R(B220)	RA3-6B2	+++	++	+++
CD49b	DX5	++	-	+
CD69	H1.2F3	++	-	-
CD185(CXCR5)	SPRCL5	++	-	-
GR-1	RB6-8C5	+++	+++	++
NK1.1	PK136	++	+	+
IgD	11-26c	+++	+++*	++
IgM	II/41	++	++*	++
TCR beta	H57-597	++	++*	++

抗原	克隆	活细胞 (IC 固定前) <sup>1</sup>	IC固定和破膜洗涤后 <sup>1</sup>	IC固定/甲醇处理后 <sup>2</sup>
<b>大鼠</b>				
CD25	OX39	+	-	
<b>犬</b>				
CD4	ykix302.9	+++	+	
CD5	ykix322.3	+++	-	
CD8a	ycate55.9	+++	++	
CD44	ykix337.8	+++	++	
CD45	ykix716.13	+++	++	
CD45R	ykix753.22	+++	++	
CD90	ykix337.217	+++	++	
MHC Class II	ykix334.2	+++	+++	

相对染色: (+++)最亮, (++) 较亮, (+) 亮, (+/-) 弱, (-) 阴性

1 使用细胞内固定&破膜液试剂盒(货号 88-8824)进行实验。细胞在室温下固定15-30分钟, 然后按照“细胞内蛋白染色 - 方案A: 两步法(胞浆)蛋白质方案”用破膜剂洗涤。

2 细胞在室温下用50%IC固定液(货号: 00-8222)固定15-30分钟, 然后按照“细胞内蛋白染色 - 方案C: 两步法固定/甲醇处理方案”, 利用90-100%甲醇冰上孵育30分钟。

\*请注意带\*号的克隆, 这表明长时间固定不利于染色。

## 细胞内蛋白染色 - 概述

- 制备单细胞悬液
- [可选]阻断Fc受体 (10-20分钟)
- 加入表面蛋白的抗体并2-8°C孵育 (30分钟)
- 用流式细胞染色缓冲液洗涤 (1-2x5分钟)
- [可选]细胞活性染料染色细胞 (20-30分钟)
- [可选]使用1X红细胞裂解液或1X一步法固定/裂解液裂解红细胞 (10-20分钟)
- 固定细胞并破膜 (30-90分钟)
- 用1X破膜液洗涤 (1x5分钟)
- 加入细胞内蛋白的抗体并2-8°C孵育 (30-60分钟)
- 用1X破膜液洗涤 (1-2x5分钟)
- 在流式细胞染色缓冲液中重悬细胞
- 使用流式细胞仪分析细胞

### 细胞内 (IC) 染色方案一览表

胞浆染色 (细胞因子)		细胞核染色 (转录因子)	
 表面蛋白染色 ▼		<b>细胞核和胞浆 (细胞因子和转录因子)</b>	
 固定细胞 ▼		 固定+破膜 ▼	
 破膜 ▼		 洗涤 ▼	
 洗涤 ▼		 洗涤 ▼	
 蛋白染色 ▼		 蛋白染色 ▼	

#### 胞浆蛋白染色液

IC细胞内固定&破膜液试剂盒(货号88-8824)

#### 试剂盒组分:

IC固定液  
破膜缓冲液 (10X)

#### 细胞核内蛋白染色液

Foxp3/转录因子染色缓冲液试剂盒(货号00-5523)

#### 试剂盒组分:

固定/破膜浓缩液  
固定/破膜稀释液  
破膜缓冲液 (10X)

## 流式细胞术中的细胞内蛋白染色

对细胞内蛋白质进行染色时，必须考虑到它在细胞内的定位，因为这关系到实验方案和固定破膜剂的选择。譬如，细胞核蛋白质和很多分泌蛋白使用Foxp3/转录因子染色缓冲液试剂盒(货号00-5523)效果最好，而细胞因子或趋化因子等分泌蛋白适用于细胞内固定&破膜液试剂盒 (货号88-8824)。

最后，部分磷酸化的信号蛋白对上述缓冲液都不适用，但可以使用固定/甲醇处理方案。抗体在各种缓冲系统和方案中的性能应通过实验来优化。

### 一般注意事项

1. 为了使荧光结合抗体性能达到最佳，应该将其2-8°C避光保存，禁止冷冻。
2. 使用之前应快速离心抗体瓶，确保抗体都在管底。不建议涡旋抗体瓶。
3. 除方案中明确指出以外，全部染色均在冰上或2-8°C下完成，尽量避光。
4. 细胞内抗原的固定和破膜步骤可能会改变细胞蛋白质的散射光信号，可能也会增加非特异性背景染色。在流式染色液中加入BSA或胎牛血清(FCS)等，有助于降低这种非特异性背景。建议使用细胞活性染料(FVD)，有助于去除死细胞的影响。

## 细胞内蛋白染色 - 方案A: 胞浆蛋白的两步法方案

下面所述方案可在单细胞水平同时分析细胞表面分子和细胞内蛋白。本方案在固定之后进行破膜处理,使抗体能够进入胞浆内。因为此破膜剂的作用是可逆的,所以,细胞内染色必须在破膜液存在的条件下完成。

此方案用于体外和体内试验的细胞活化后,检测细胞内的胞浆蛋白质、细胞因子或其他分泌蛋白。在检测细胞因子时,刺激条件与细胞因子的分泌时间,取决于分析的细胞类型和特定的细胞因子。如需了解详情,请参见“**蛋白质转运抑制剂的考虑因素**”(第58页)。

**注:** 如要检测细胞核蛋白质,例如转录因子,请参见“**方案B: 细胞核蛋白的单步法方案**”(第66页)。如要检测某些磷酸化的信号蛋白(例如: MAPK和STAT蛋白),推荐使用“**方案C: 两步法固定/甲醇处理方案**”(第69页)。

### 材料

- 12 x 75 mm流式管
- [可选]细胞活性染料 (FVD) eFluor™ 455UV(货号65-0868), eFluor™ 450 (货号65-0863), eFluor™ 506(货号65-0866), eFluor™ 520 (货号65-0867), eFluor™ 660(货号65-0864), eFluor™ 780 (货号65-0865)
- 荧光直标抗体
- 细胞内固定&破膜液试剂盒(货号88-8824)
- 流式细胞染色缓冲液(货号00-4222)
- 细胞刺激混合液(加蛋白质转运抑制剂)(500X)(货号00-4975) 或
- 蛋白转运抑制剂混合液(500X)(货号00-4980) 或
- Brefeldin A溶液(货号00-4506)或
- 莫能菌素溶液Monensin(货号00-4505)

### 缓冲液和溶液的制备

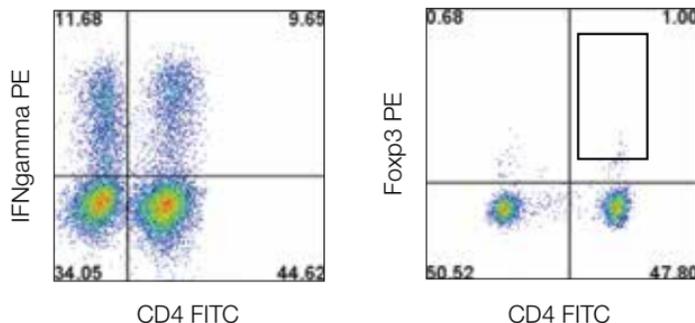
将1体积10X浓缩液与9体积蒸馏水混合,制备1X的破膜缓冲液。每份样本需要8.5mL的1X破膜液。

## 细胞内蛋白染色 - 方案A: 胞浆蛋白的两步法方案

### 实验步骤

1. 制备单细胞悬液。详情参见“**流式细胞技术的细胞制备方案**” (第24页)。
2. [可选]细胞活性染料染色细胞。详情参见“**细胞活性染料方案, 方案C**” (第98页)。
3. 进行细胞表面染色。详情参见“**细胞表面蛋白染色, 方案A**” (第51页)。
4. 最后一次洗涤后, 弃上清, 并涡旋样本, 直到细胞团块完全分离。通常残留液量大约为100 $\mu$ L。
5. 加入100 $\mu$ L IC固定液固定细胞, 然后涡旋混匀。
6. 室温避光孵育20-60分钟。
7. 加入2mL 1X破膜液, 室温400-600xg离心5分钟, 弃上清。
8. 重复第7步。
9. 加入100 $\mu$ L 1\*破膜剂重悬细胞。加入荧光结合一级抗体, 室温避光孵育20-60分钟。
10. 加入2mL 1X破膜液, 室温400-600xg离心5分钟, 弃上清。

11. 重复第10步。
12. 在适量的流式细胞染色缓冲液中重悬染色的细胞。
13. 使用流式细胞仪分析样本。



### 细胞内 (IC) 固定和破膜步骤

先用胞内固定/破膜试剂盒(货号 88-8824)固定和透化细胞, 然后用抗小鼠CD4 FITC(货号 11-0042)和抗小鼠IFN gamma PE (货号 12-7311 [左图])或抗小鼠/大鼠Foxp3 PE (货号 12-5773 [右图])进行细胞内染色。右图所示为Foxp3染色, 如图所示胞内固定/破膜液试剂盒不建议用于细胞核内染色。而是应该参见Foxp3/转录因子缓冲液试剂盒(货号 00-5523)和细胞内蛋白染色 - 方案B: 细胞核蛋白的一步法方案 (第66页)。圈淋巴细胞后分析门内细胞。

## 细胞内蛋白染色 - 方案B: 细胞核蛋白的一步法方案

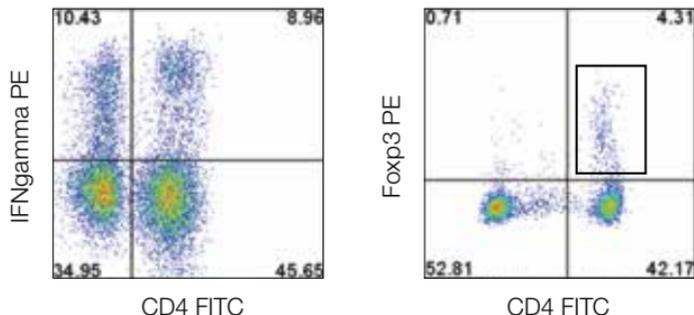
下面所述方案可在单细胞水平同时分析细胞表面分子和胞内抗原(包括细胞核抗原)。此方案将固定和破膜过程合并为一步,推荐用于检测细胞核抗原(例如:转录因子),但也可用于检测很多细胞因子。有关Foxp3/转录因子染色缓冲液试剂盒(货号 00-5523)与细胞因子抗体的相容性,请浏览<http://us.ebioscience.com/resources/application/flow-cytometry/intracellular-staining-buffer-guide.htm>,了解抗体克隆的性能。

### 材料

- 12 x 75 mm流式管,或96孔U形或V形底微孔板
- [可选]细胞活性染料(FVD) eFluor™ 455UV(货号 65-0868), eFluor™ 450(货号 65-0863), eFluor™ 506(货号 65-0866), eFluor™ 520(货号 65-0867), eFluor™ 660(货号 65-0864), eFluor™ 780(货号 65-0865)
- [可选]正常小鼠血清(货号 24-5544)
- [可选]正常大鼠血清(货号 24-5555)
- 荧光直标抗体
- Foxp3/转录因子染色缓冲液试剂盒(货号 00-5523)
- 流式细胞染色缓冲液(货号 00-4222)

### 缓冲液的制备

- 将1体积Foxp3固定/破膜浓缩液与三体积Foxp3固定/破膜稀释液混合在一起,制备新鲜的Foxp3固定/破膜工作液。如果在流式管中进行染色,则每个样本需要1ml工作液。
- 将1体积10X破膜缓冲液与9体积蒸馏水混合,制备1X的破膜缓冲液。如果在流式管中进行染色,则每个样本需要8.5 ml工作液。



### Foxp3转录因子染色

先用Foxp3/转录因子染色缓冲液试剂盒(货号 00-5523)固定和破膜细胞,然后用抗小鼠CD4 FITC(货号 11-0042)和抗小鼠IFN gamma PE(货号 12-7311 [左图])或抗小鼠/大鼠Foxp3 PE(货号 12-5773 [右图])进行细胞内染色。圈淋巴细胞后分析门内细胞。

## 细胞内蛋白染色 - 方案B：细胞核蛋白的一步法方案

### 方案B1：12 x75mm流式管中的实验操作

1. 制备单细胞悬液。详情参见“**流式细胞术的细胞制备方案**”（第24页）。
2. [可选]细胞活性染料染色细胞。详情参见“**活性染料染色, 方案C**”（第98页）。
3. 进行细胞表面染色。详细说明参见“**细胞表面蛋白染色, 方案A**”（第51页）。
4. 最后一次洗涤后, 弃上清, 并涡旋样本, 直到细胞团块完全分离。通常残留液量大约为100 $\mu$ L。
5. 每管加入1mL 1X Foxp3固定/破膜缓冲液并涡旋。
6. 2-8°C或室温避光孵育30-60分钟。(小鼠样本可在2-8°C避光贮藏18小时)。
7. 每管加入2mL 1X破膜液, 室温400-600xg离心5分钟, 弃上清。
8. [可选]重复第7步。
9. 在残留的1X破膜液中重悬细胞。倒出上清液后大约残留100 $\mu$ L。
10. [可选]向细胞中加入2%正常小鼠/大鼠血清进行封闭, 室温孵育15分钟。
11. 不用洗涤, 向细胞中加入荧光直标抗体, 室温避光孵育至少30分钟。
12. 每管加入2mL 1X破膜液, 室温400-600xg离心5分钟, 弃上清。
13. 重复第12步。
14. 加入适量的流式细胞染色缓冲液重悬染色的细胞。
15. 使用流式细胞仪分析样本。

## 细胞内蛋白染色 - 方案B：细胞核蛋白的一步法方案

### 方案B2：96孔板中的实验操作

1. 制备单细胞悬液，详情参见“**流式细胞术的细胞制备方案**”（第24页）。
2. [可选]细胞活性染料染色细胞。详情参见“**活性染料染色，方案C**”（第98页）。
3. 进行细胞表面蛋白染色，详细说明参见“**细胞表面蛋白染色，方案A**”（第51页）。
4. 最后一次洗涤后，弃上清，并涡旋样本，直到细胞团块完全分离。
5. 每孔内加入200 $\mu$ L Foxp3固定/破膜工作液。理想的状态是，细胞为单细胞悬液。可用移液器吹打。
6. 2-8°C或室温避光孵育30-60分钟。（小鼠样本可在2-8°C避光贮藏18小时）。
7. 室温400-600xg离心5分钟，弃上清。
8. 每孔加入200 $\mu$ L 1X破膜液，室温400-600xg离心5分钟，弃上清。
9. 重复第8步。
10. 重悬残留溶液中的细胞，然后用1X破膜液将体积调节至100 $\mu$ L。
11. [可选]细胞中加入2 $\mu$ l 2%正常小鼠/大鼠血清进行封闭，室温下孵育15分钟。
12. 不洗涤，向细胞中加入荧光直标抗体，室温避光孵育至少30分钟。
13. 每孔加入200 $\mu$ L 1X破膜液，室温400-600xg离心5分钟，弃上清。
14. 重复第13步。
15. 在适量的流式细胞染色缓冲液中重悬染色的细胞。
16. 使用流式细胞仪分析样本。

## 细胞内蛋白染色-方案C：固定/甲醇处理两步法方案

以下方案可同时分析细胞表面分子和细胞内的一些磷酸化信号蛋白。该方案首先是固定细胞，其次是用甲醇处理细胞。在检测磷酸化蛋白质时，刺激条件与磷酸化的动力学，取决于分析的细胞类型和特定的信号通路。例如，要诱导 phospho-STAT1 (Y701)的磷酸化，需要用IFN- $\gamma$ 诱导巨噬细胞，而phospho-ERK1/2 (T202/Y204)是在经过PMA (佛波酯，蛋白激酶C激活剂)或CD3抗体活化后的T细胞中表达。

荧光染料对甲醇的耐受性	
耐甲醇	不耐甲醇
FITC	PE
Alexa Fluor™ 488	PE串联染料
eFluor™ 660	PerCP
Alexa Fluor™ 647	PerCP-串联染料
eFluor™ 450	APC
eFluor™ 506	APC-串联染料
	eVolve™

### 一般注意事项

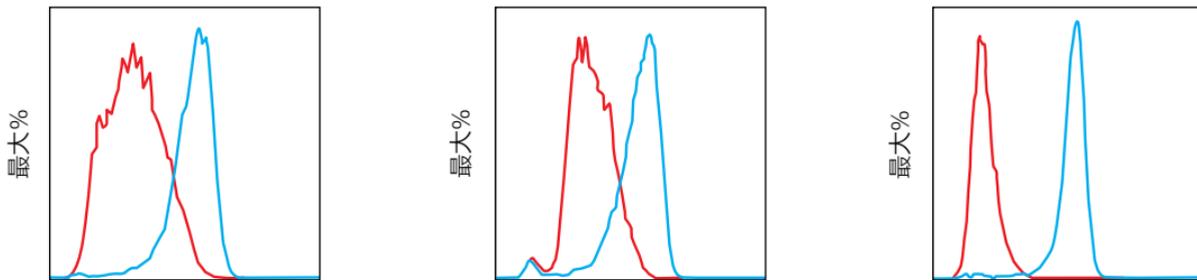
1. 荧光直标抗体可用来染色细胞表面蛋白，进行免疫表型分析，同时可以进一步分析磷酸化蛋白；但是，为确保染色还需考虑下列问题：
  - 活细胞表面抗体染色可以改变信号蛋白的表达，因为它可能会刺激/抑制信号通路。因此，在刺激细胞之前不建议进行表面染色。而应在细胞内蛋白染色的同时染色表面蛋白。请注意，一些蛋白质除了分布在表面之外，还聚集在细胞内，这一点必须考虑。应该评估和使用能识别固定细胞/表位的表面蛋白的抗体克隆。参见第60页，“**固定/破膜后抗体克隆的性能**”章节。
  - 如在固定前需进行表面染色（因为固定会破坏表位），只有在荧光染料能耐受甲醇处理的情况下，才能在固定/甲醇处理步骤之前，用荧光直标抗体染色细胞（参见左侧表）

## 细胞内蛋白染色-方案C：固定/甲醇处理两步法方案

2. 对于贴壁细胞，我们建议在板/微孔中进行固定。固定之后，刮下细胞或用EDTA溶液处理，以便收集细胞并进行操作。如果无需表面染色，或表面蛋白质耐受胰蛋白酶消化，可以使用胰蛋白酶进行细胞消化。

### 材料

- 12 x 75 mm流式管，或96孔U形或V底板
- 选用的细胞培养基
- 选用的细胞刺激剂
- 荧光直标抗体
- 流式细胞染色缓冲液(货号 00-4222)
- IC固定液(货号 00-8222)
- 90-100%甲醇 (HPLC级)
- [可选]Fc阻断：纯化抗小鼠CD16/CD32(货号 14-0161)或纯化人Fc受体结合抑制剂(货号 14-9161)



### phospho-ZAP-70/SYK (Y319/Y352) APC在不同固定和破膜液中的表现

在37°C下，利用H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>活化的过氧酸钠处理Jurkat T细胞（蓝色直方图），或者不处理（红色直方图）。然后将细胞分为用细胞内固定/破膜液试剂盒(货号 88-8824[左图])、Foxp3/转录因子染色缓冲液试剂盒(货号 00-5523 [中图])固定并破膜细胞，或用IC固定液(货号 00-8222)固定，然后用甲醇破膜（右图）。随后，用抗人/小鼠phospho-ZAP-70/SYK (Y319/Y352) APC (货号 17-9006)进行细胞内染色并使用流式细胞仪进行分析。

## 方案C1：12x75mm流式管内的实验操作

1. 根据实验制备待刺激细胞。
2. 进行细胞计数，并用合适的培养基重悬细胞，使其终浓度为 $1-5 \times 10^6$ 细胞/mL。
3. 37°C刺激培养细胞，根据实验需要确定刺激条件和刺激时间。建议在37°C下孵育未处理的细胞，作为阴性对照。
4. [可选]如在固定前需表面染色（在第5步），按照“**流式细胞术中染色细胞表面蛋白的方案**”（第48页）的描述，用与耐甲醇荧光染料（参见第69页表）结合的抗体进行染色。
5. 刺激结束后，向细胞中直接加入等量的IC固定液固定细胞并终止刺激，然后涡旋重悬细胞。
6. 室温避光孵育10-60分钟。
7. 室温400-600xg离心5分钟，弃上清。
8. 重悬细胞，并加入1mL预冷的90-100%甲醇。涡旋混匀，并在2-8°C下至少孵育30分钟。

**注：**将细胞放入甲醇后，可在 $< -20^\circ\text{C}$ 下存放4周。

9. 加入2ml流式细胞染色缓冲液洗涤细胞。

10. 室温400-600xg离心5分钟，弃上清。
11. 在流式细胞染色缓冲液中重悬细胞，使浓度达到 $1 \times 10^7$ 细胞/mL，然后取 $1 \times 10^6$ 细胞（100 $\mu\text{L}$ ）放入另一试管内。
12. [可选]可在染色之前，用抗小鼠CD16/CD32或人Fc受体结合抑制剂，阻断细胞Fc介导非特异性结合。
13. 每管加入推荐量的荧光直标抗体，室温避光孵育30-60分钟。

**注：**如需要，可同时进行表面染色和细胞内磷酸化染色。并非全部抗体克隆均能与固定表位结合，因此可参见“**固定/破膜后的抗体克隆表现**”表（第60页）。

14. 每管加入2mL流式细胞染色缓冲液室温400-600xg离心4-5分钟，弃上清。
15. 重复第14步。
16. 在适当体积的流式细胞染色缓冲液中重悬染色后的细胞。
17. 使用流式细胞仪分析样本。

## 方案C2：96微孔板内的实验操作

1. 根据实验设计制备待刺激细胞。
2. 进行细胞计数，并用合适的培养基重悬细胞，使其终浓度为  $1-5 \times 10^6$  细胞/mL。
3. 每孔加入100 $\mu$ L含刺激物的缓冲液。
4. 每孔加入100 $\mu$ L细胞，并在37°C下孵育一定时间。建议在37°C下孵育未处理的细胞，作为阴性对照。
5. [可选]如在固定前需表面染色（在第6步），按照“**流式细胞技术中细胞表面蛋白染色方案**”（第48页）的描述，用与耐甲醇荧光染料（参见第69页表）结合的抗体进行染色。
6. 刺激结束后，向微孔内直接加入200 $\mu$ L IC固定液固定细胞并终止刺激。
7. 室温避光孵育10-60分钟。
8. 室温600xg离心4-5分钟，弃上清。
9. 重悬细胞，并在孔内加入100 $\mu$ L预冷的90-100%甲醇。涡旋混匀，并在2-8°C下或冰上至少孵育30分钟。

**注：**细胞放入甲醇中后，可在<20°C下存放4周。

10. 每孔加入200  $\mu$ L流式细胞染色缓冲液，室温600xg离心4-5分钟，弃上清。
  11. 重复第10步。
  12. [可选]可在染色之前，用抗小鼠CD16/CD32或人Fc受体结合抑制剂，阻断细胞Fc受体介导的非特异性结合。
  13. 每孔内加入推荐体积的荧光直标抗体，室温避光孵育30-60分钟。
- 注：**如果需要，可同时进行表面染色和细胞内磷酸化染色。并非全部抗体克隆均能与固定表位结合，因此可参见“**固定/破膜后的抗体克隆表现**”表（第60页）。
14. 每孔加入200  $\mu$ L流式细胞染色缓冲液，室温600xg离心4-5分钟，弃上清。
  15. 重复第14步。
  16. 在适量体积的流式细胞染色缓冲液中重悬染色的细胞。
  17. 使用流式细胞仪分析样本。

## 人细胞因子：细胞内染色快速指南

人细胞因子	细胞来源	活化	培养时间	再次刺激	细胞内阻断	抗体克隆
G-CSF	PBMC	LPS (1ug/mL)	24小时	-	莫能菌素	8F5CSF
IFN $\gamma$	PBMC	PMA (30-50ng/mL)/Iono (1ug/mL)	5小时	-	BFA	4S.B3
IL-1 $\alpha$	PBMC	LPS (1 ug/mL)	24小时	-	莫能菌素	364/3B3-14
IL-1 $\beta$	PBMC	LPS (100 ug/mL)	4小时	-	BFA	CRM56
IL-1RA	PBMC	LPS (100 ug/mL)	24小时	-	BFA	CRM17
IL-2	PBMC	PMA (30-50ng/mL)/Iono (1ug/mL)	4-6小时	-	BFA	MQ1-17H12
IL-4	PBMC	PMA (30-50ng/mL)/Iono (1ug/mL)	4-6小时	-	BFA	8D4-8
IL-5	CD4	Th2极化培养	6天	PMA (50ng/mL) + 离子霉素(1ug/mL) (5小时)	BFA	TRFK5, JES1-5A10
IL-6	PBMC	LPS (100ng/mL)	24小时	-	BFA	MQ2-13A5
IL-9	CD4	Th2极化培养	6天	PMA (50ng/mL) + 离子霉素(1ug/mL) (5小时)	莫能菌素	MH9A4
IL-10	CD4	Th2极化培养	6天	PMA (50ng/mL) + 离子霉素(1ug/mL) (5小时)	莫能菌素	JES3-9D7
IL-12/ IL-23 (p40)	PBMC	hIFN gamma (100ng/mL) (2小时)/LPS(100ng/mL) (22小时)	2小时/22小时	-	BFA	C8.6
IL-17A	PBMC	Th17极化培养	6天	PMA (50ng/mL) + 离子霉素(1ug/mL) (5小时)	BFA	eBio64CAP17,
IL-21	PBMC	PMA (30-50ng/mL)/Iono (1ug/mL)	4-7小时或12-18小时	-	BFA	eBio3A3-N2
IL-22	CD4	Th17极化培养	6天	PMA (50ng/mL) + 离子霉素(1ug/mL) (5小时)	BFA	IL22JOP
IL-23 p19	PBMC	hGM-CSF (40ng/mL) + hIL-4 (40ng/mL)	6天	LPS (1ug/mL) (24小时)	莫能菌素	23dcdp
MCP-1/ CCL2	PBMC	LPS (1ug/mL)	24小时	-	莫能菌素	2H5, 5D3-F7
RANTES/ CCL5	PBMC	LPS (1ug/mL)	24小时	-	莫能菌素	VL1
TNF $\alpha$	PBMC	PMA (30-50ng/mL)/Iono (1ug/mL)	5小时	-	BFA	MAb11
TNF $\beta$	PBMC	Th1极化培养	6天	PMA (50ng/mL) + 离子霉素(1ug/mL) (5小时)	莫能菌素	359-81-11

## 人细胞因子：细胞内染色快速指南

缩写: Iono=离子霉素; PMA= 佛波酯; LPS=脂多糖; 用来活化人体PBMC的LPS从Sigma公司购买 (#L-8274)

人细胞因子	细胞来源	活化	培育时间	再次刺激	细胞内阻断	抗体克隆
G-CSF	小鼠脾脏	ConA (3ug/mL) (2天)/IL-2(20ng/mL)+IL-4 (20ng/mL) (3天)	2天/3天	Anti-CD3 (10ug/mL 可固定的) + anti-CD28 (2ug/mL 可溶的) 5小时	BFA	MP1-22E9
IFN $\gamma$	小鼠脾脏	ConA (3ug/mL) (2天)/IL-2(20ng/mL)+IL-4 (20ng/mL) (3天)	2天/3天	Anti-CD3 (10ug/mL 可固定的) + 抗-CD28 (2ug/mL 可溶的) 5小时	BFA	XMG1.2
IL-1 $\alpha$	小鼠PEC	mIFN gamma (100ng/mL) (2小时)/LPS(100ng/mL)(22小时)	2小时/22小时	-	BFA	ALF-161
IL-1 $\beta$	小鼠PEC	LPS (100 ng/mL) (22小时)	22小时	-	莫能菌素	NJTEN3
IL-2	小鼠脾脏	ConA (3ug/mL) (2天)/IL-2(20ng/mL)+IL-4 (20ng/mL) (3天)	2天/3天	Anti-CD3 (10ug/mL 可固定的) + anti-CD28 (2ug/mL 可溶的) 5小时	BFA	JES6-5H4
IL-4	小鼠脾脏	Th2极化	6天	PMA (50 ng/mL) + 离子霉素(1 ug/mL) 5小时	BFA	BVD6-24G2, 11B11
IL-5	小鼠脾脏 CD4	ConA (3ug/mL) (2天)/IL-2(20ng/mL)+IL-4 (20ng/mL) (3天)	2天/3天	可固定的) + anti-CD28(2ug/mL 可溶的) 5小时	BFA	TRFK5
IL-6	小鼠PEC	LPS (100 ng/mL) (22小时)	22小时	-	莫能菌素	MP5-20F3
IL-10	小鼠脾脏	ConA (3ug/mL) (2天)/IL-2(20ng/mL)+IL-4 (20ng/mL) (3天)	2天/3天	Anti-CD3 (10ug/mL 可固定的)+ anti-CD28 (2ug/mL 可溶的) 5小时	BFA	JES5-16E3, JES5-2A5
IL-12/ IL-23 (p40)	小鼠PEC	LPS (100 ng/mL) (22小时)	22小时	-	BFA	C17.8
IL-13	小鼠脾脏	Th2 极化	6天	PMA (50 ng/mL) + 离子霉素(1 ug/mL) 5小时	BFA	eBio13A
IL-17A	小鼠脾脏	Th17极化	6天	PMA (50 ng/mL) + 离子霉素(1 ug/mL) 5小时	莫能菌素	eBio17B7
IL-17F	小鼠脾脏	Th17极化	6天	PMA (50 ng/mL) + 离子霉素(1 ug/mL) 5小时	莫能菌素	eBio18F10
IL-21	小鼠脾脏	Th17极化	9天	PMA (50 ng/mL) + 离子霉素(1 ug/mL) 5小时	莫能菌素	FFA21
IL-22	小鼠脾脏	Th17极化	12天	PMA (50 ng/mL) + 离子霉素(1 ug/mL) 5小时	BFA	IL22JOP
IL-23 p19	PBMC	hGM-CSF(40ng/mL)+hIL-4 (40ng/mL)	6天	LPS (1ug/mL) (24小时)	莫能菌素	23dcdp

## 人细胞因子：细胞内染色快速指南（续）

缩写：小鼠PEC=小鼠腹膜巨噬细胞-硫基乙酸引起；ConAn=刀豆蛋白A；Iono=离子霉素；LPS=脂多糖；PMA=佛波酯

人细胞因子	细胞来源	活化	培育时间	再次刺激	细胞内阻断	抗体克隆
MCP-1/ CCL2	PBMC	LPS (1ug/mL)	24小时	-	莫能菌素	2H5, 5D3-F7
RANTES/ CCL5	PBMC	LPS (1ug/mL)	24小时	-	莫能菌素	VL1
TNF $\alpha$	PBMC	PMA (30-50ng/mL)/Iono (1ug/mL)	5小时	-	BFA	MAB11
TNF $\beta$	PBMC	Th1极化培养	6天	PMA (50 ng/mL) + 离子霉素(1 ug/mL) 5小时	莫能菌素	359-81-11

缩写：小鼠PEC=小鼠腹膜巨噬细胞-硫基乙酸引起；ConAn=刀豆蛋白A；Iono=离子霉素；LPS=脂多糖；PMA=佛波酯



# 流式细胞术的BrdU染色方案

## 引言

细胞增殖研究对肿瘤导致的细胞异常生长，以及细胞发育、调控和分化具有重要意义。BrdU是一种合成的胸腺嘧啶类似物，能掺入到处于S期细胞的DNA中。BrdU的含量可以利用抗BrdU抗体检测。

## 材料

- BrdU Staining Kit for Flow Cytometry APC, (货号 8817-6600)
- BrdU Staining Kit for Flow Cytometry eFluor™ 450, (货号 8848-6600)
- BrdU Staining Kit for Flow Cytometry FITC, (货号 8811-6600)
- BrdU Staining Kit for Flow Cytometry PE, (货号 8812-6600)
- BrdU Staining Kit for Flow Cytometry PerCP-eFluor™ 710, (货号 8846-6600)
- 每个试剂盒内含：
  - BrdU (5-溴化脱氧尿嘧啶核苷) (32.5 mM, 10 mg/mL): 5x1mL无菌瓶; 贮藏在 $\leq -70^{\circ}\text{C}$ 下。避免反复冻融。应该在无菌条件下开启。
  - DNase I (1 mg/mL; 0.3 mg/瓶): 10 x 0.3 mL瓶; 贮藏在 $\leq -70^{\circ}\text{C}$ 下。每瓶可用来处理10份样本。避免反复冻融。

- 荧光标记抗BrdU抗体 (克隆号BU20A), 单瓶100反应; 贮藏在 $2-8^{\circ}\text{C}$ 下。
- BrdU染色缓冲浓缩液 (4X); 1 x 30 mL瓶; 贮藏在 $2-8^{\circ}\text{C}$ 下。
- 固定/破膜稀释液; 单瓶100mL; 贮藏在 $2-8^{\circ}\text{C}$ 下。

## 其他所需材料

- 无菌1X PBS
- 流式细胞染色缓冲液(货号 00-4222)
- 12 x 75 mm流式管

## 可选:

- 荧光直标抗体
- 细胞活性染料 (FVD) eFluor™ 450(货号 65-0863), eFluor™ 660 (货号 65-0864), eFluor™ 780 (货号 65-0865), eFluor™ 506 (货号 65-0866), eFluor™ 520 (货号 65-0867), eFluor™ 455UV (货号 65-0868)

**注:** BrdU和细胞活性染料 (FVD) 标记之后, 可以加入用于表面染色的抗体 (但需在固定之前)。但已明确能够识别出甲醛固定后表位的抗体, 则可以与BrdU抗体同时加入。

## 流式细胞术中的BrdU染色方案

### BrdU染色工作缓冲液的制备

将1份浓缩BrdU染色缓冲液与3份固定/破膜稀释液混合，制备出1X BrdU染色工作缓冲液。轻轻颠倒混匀溶液，不能涡旋。每份样本需要1mL的1X BrdU染色工作缓冲液。

### 实验步骤

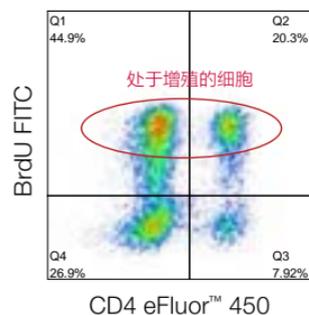
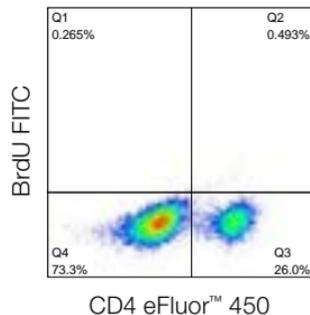
1.  $10^5$ - $10^8$ 个细胞加入10uM BrdU, 37°C体外培养45分钟:
  - a) 在无菌环境下, 将BrdU放在冰块上解冻, 并用无菌1X PBS 稀释为浓度1mM的工作液。
  - b) 每份样本中加入10  $\mu$ M BrdU。(例如, 直接向每1mL培养基中加入10  $\mu$ L的1mM BrdU)。
  - c) 培育细胞, 使得BrdU嵌入DNA。培养时间取决于培养条件(例如: 使用的刺激剂)和细胞的增殖速度。因此, 培育时间需根据测试确定。培育之后收集细胞。
- d) 加入2mL 流式细胞染色缓冲液(如果需要进行第2步操作, 也可用不含叠氮化物的PBS)洗涤细胞, 室温300-400xg离心5分钟, 弃上清。
2. [可选]在固定之前, 用细胞活性染料(FVD)标记死细胞。详情参见“**活性染料染色, 方案C**”(第98页)。
3. [可选]染色细胞表面抗原。详细说明参见“**细胞表面抗原染色, 方案A**”(第51页)。
4. 固定细胞并用抗BrdU抗体进行细胞内染色。
  - a) 在冰块上解冻DNase I溶液并制备DNase I工作液。方法是将300 $\mu$ L DNase I液体加入到700 $\mu$ L流式细胞染色缓冲液中, 然后轻轻混匀。置于冰上直到进行第4g步。
  - b) 如果未进行第2步和第3步的细胞染色, 每管加入100 $\mu$ L细胞悬液。细胞数量需根据测试决定, 但范围应该在每管 $10^5$ 至 $10^8$ 个之间。
  - c) 轻轻重悬第2, 3, 或4b步得到的细胞。在加入新制备的1X BrdU染色工作缓冲液之前, 该重悬步骤十分重要。

## 流式细胞术中的BrdU染色方案

- d) 加入1mL新制备的1X BrdU染色工作缓冲液并轻轻混匀。室温避光孵育15分钟。孵育时间可以延长(最长14小时),但应依照细胞类型决定。
- e) 加入2mL流式细胞染色缓冲液,室温300-400xg离心5分钟,弃上清。
- f) 重复第4e步。
- g) 向每份样本内加入100 $\mu$ L第4a步制备的DNase I工作液。37°C避光孵育1小时。
- h) 加入2mL流式细胞染色缓冲液,室温300-400xg离心5分钟,弃上清。
- i) 重复第4h步。然后每份样本内加入5 $\mu$ L抗BrdU荧光染料直标抗体,混匀,室温避光孵育20-30分钟。

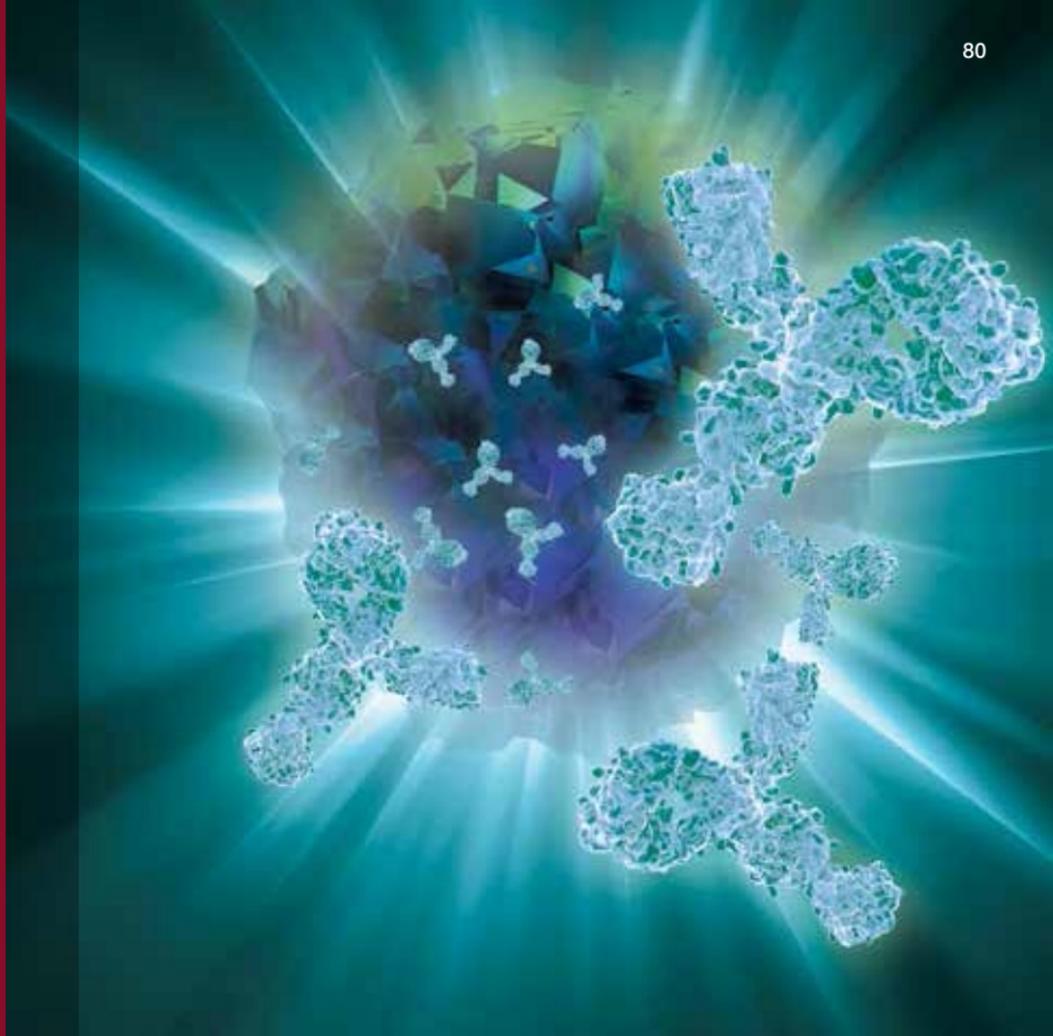
**注:** 此时可加入未在第3步染色的表面或胞内抗体。该步骤中用于表面染色的抗体必须能识别被固定后的表位。如果抗体只识别原生表位,或不确定,我们建议在第3步中染色。

- j) 加入2mL流式细胞染色缓冲液,室温300-400xg离心5分钟,弃上清。
- k) 重复第4j步。
5. 在流式细胞染色缓冲液中重悬细胞。
6. 使用流式细胞仪分析样本。



### BrdU检测S期的增殖

利用抗小鼠CD4eFluor™ 450(货号 48-0041)和BrdU染色试剂盒的抗BrdU FITC(货号 8811-6600),对BrdU未标记(左图)和标记(右图)的抗小鼠CD3和CD28刺激小鼠脾细胞进行细胞内染色。



## 功能性染料

- 细胞示踪和增殖染料 . . . . . 82
  - CellVue™ 染料标记 . . . . . 82
  - 增殖染料染色 . . . . . 83
    - 方案A: 细胞增殖染料 (CPD) eFluor™ 670 . . . . . 85
    - 方案B: 细胞增殖染料 (CPD) eFluor™ 450 . . . . . 86
    - 方案C: 羧基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺脂 (CFSE) . . . . . 88
- DNA标记和活性 (死/活) 染料 . . . . . 89
  - 标记活细胞内DNA . . . . . 93
  - 细胞活性染料染色步骤 . . . . . 94
    - 方案A: 用PI或7-AAD染色死细胞 . . . . . 95
    - 方案B: 用钙黄绿素染料染色活细胞 . . . . . 96
    - 方案C: 用FVD染色死细胞 . . . . . 98
    - 备选方案 (方案C3-C5) . . . . . 100
- 钙离子染料 . . . . . 104
  - 方案: 钙离子染料eFluro™ 514和Indo-1 AM . . . . . 104

## 功能性染料- 细胞示踪和增殖染料

### 利用CellVue™染料标记细胞

CellVue™ 是一种亲脂性染料，可以用来标记细胞膜，以识别和跟踪被标记的细胞。细胞标记过程快速而稳定，能够与荧光标记的抗体和其他细胞功能标记物并用，用于流式细胞分析和荧光显微镜检查。

#### 一般注意事项

- Mini CellVue™ 试剂盒中含有一瓶染料原液（1mM的乙醇溶液）和一瓶标记介质（稀释液C）；Midi CellVue™试剂盒内含两瓶染料原液（1mM的乙醇溶液）和六瓶稀释液C。
- 所有过程均在室温下进行。标记过程中不应使用含有叠氮化物或其他代谢抑制剂的试剂。

### 实验步骤

**注：**该方案经过体内或体外细胞标记的测试。因为标记有赖于细胞膜结合染料，因此如果染料浓度过高，或者标记时间过长，都会破坏细胞膜完整性，细胞状态也会较差。应该在单克隆抗体染色之前，利用CELLVUE™染料标记。研究者应该根据实验需要摸索标记的条件和浓度，确保染料发挥最佳性能。

1. 利用不含血清的培养基洗涤细胞，去除会干扰细胞标记的血清蛋白质和脂质。
2. 小心地倒掉上清液，留下不超过25 $\mu$ L的培养基。
3. 用稀释液C重悬细胞，使浓度达到 $2 \times 10^7$ 细胞/mL，禁止涡旋。吹打几次，确保形成单细胞悬液。
4. 标记前用稀释液C制备2X染料工作液。如果染料的终浓度是2 $\mu$ M，需将4 $\mu$ l 1mM染色原液加到1ml稀释液C中，制备4 $\mu$ M染色浓液。为确保标记均匀，不能将染料原液直接加入单细胞悬液中。

## 功能性染料- 细胞示踪和增殖染料

5. 快速将1mL细胞加入到1mL 2X染色工作液内, 吹打混匀样本, 确保标记均匀。最终细胞浓度应该约为 $1 \times 10^7$ 细胞/mL, 最终染料溶度应该为2 $\mu$ M。
6. 孵育2-5分钟, 孵育期间需混匀几次。孵育时间越长标记越明亮, 但是应避免过久对细胞活性产生影响。
7. 加入等量的血清孵育1分钟终止标记。
8. 离心细胞并弃上清。
9. 使用完全培养基洗涤细胞三次(不用稀释液C)。为降低残留染料的干扰, 将细胞转移到新试管中。
10. 根据需要进行细胞计数、培养或转移。

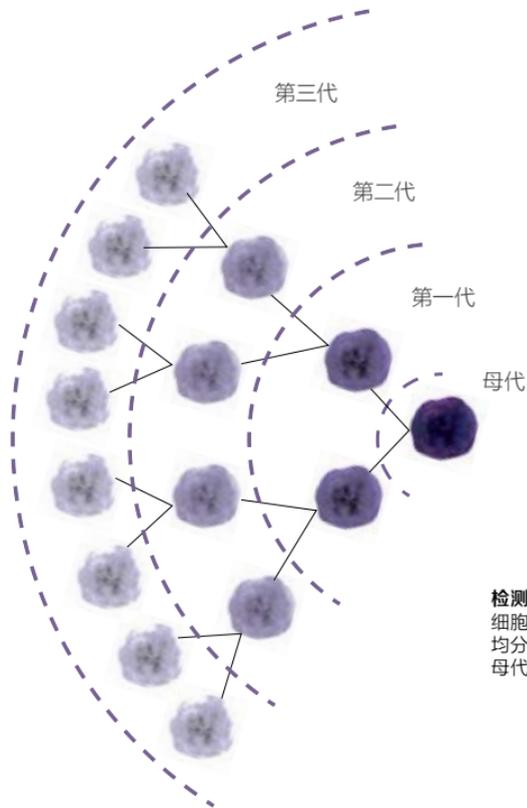
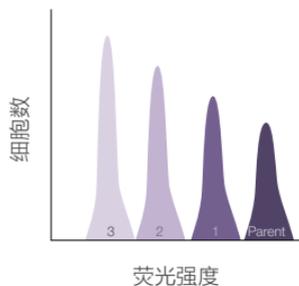
## 利用增殖染料染色细胞

细胞增殖染料(CPD) eFluor™ 670, CPD eFluor™ 450, 和5- (和6) -羧基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺脂 (CFSE) 是可以监测单细胞分裂的荧光染料。该染料可以在体内跟踪未分裂的细胞数周。该染料与细胞蛋白质形成共价反应。随着细胞分裂, 该染料会均分到子代细胞中, 荧光强度减为原来的一半。根据使用的染料, 我们可以继续观察6-8代细胞。

增殖染料标记的细胞可以被含甲醛的固定剂和皂角素的破膜液固定并破膜, 例如Foxp3/转录因子染色缓冲液试剂盒(货号 00-5523)或细胞内固定&破膜液试剂盒(货号 88-8824), 然后进行细胞内抗原的分析。

## 细胞增殖染料染色步骤

- 制备单细胞悬液
- 利用PBS洗涤去除血清 (2x5分钟)
- 在PBS中重悬细胞
- 加入增殖染料, 在适当的温度下避光孵育 (10-20分钟)
- 加入完全培养基, 冰上孵育 (5分钟)
- 用完全培养基洗涤细胞 (3x5分钟)
- 根据需要进行细胞培养或转移



### 检测细胞分裂

细胞分裂导致染料在子代之间平均分布。子代细胞的荧光强度是母代细胞的一半。

## 功能性染料 - 方案A: 细胞增殖染料 (CPD) eFluor™ 670

### 材料

- CPD eFluor™ 670 (货号 65-0840)
- 无菌1X PBS
- 二甲基亚砜 (DMSO), 无水
- 完全培养基 (含 $\geq 10\%$ 血清)

### 实验过程

1. 一管CPD eFluor™ 670中加入126  $\mu\text{L}$ 无水DMSO溶解形成5mM染料原液。

**注:** 稀释之后, 应避免光存放在 $-20^{\circ}\text{C}$ 的条件下, 干燥保存。建议在6个月内使用该染料, 避免反复冻融。

2. 制备需要标记的单细胞悬液。(参见“**流式细胞术的细胞制备方案**”, 第24页)
3. 利用PBS洗涤细胞两次, 清除所有血清。
4. 在PBS (预热至室温) 中重悬细胞, 使浓度达到最终所需细胞浓度的两倍。例如, 最终浓度为 $1 \times 10^7$ 细胞/mL, 则重悬细胞浓度为 $2 \times 10^7$ 细胞/mL。

**注:** 最终细胞浓度不应超过 $10 \times 10^6$ 细胞/mL。如果标记细胞总数不超过 $5 \times 10^6$ 细胞/mL, 则使用的PBS不应少于0.5mL。

5. 使用 (预热至室温) PBS制备 $10 \mu\text{M}$ 的CPD eFluor™ 670。按照1:1的比例混合CPD工作液和第6步制备的2X细胞悬液。

**注:** 建议将 $5 \mu\text{M}$ 作为标记细胞的起始点; 但是, 强烈建议根据测试结果确定最佳浓度。

6. 一边涡旋2X细胞悬液, 一边加入等量的第5步制备的染料溶液。
7.  $37^{\circ}\text{C}$ 避光孵育10分钟。
8. 加入4-5体积量的预冷完全培养基 (含 $\geq 10\%$ 血清) 终止标记, 并在冰上孵育5分钟。
9. 用完全培养基洗涤细胞三次。
10. 根据需要进行细胞培养和转移。

**注:** 利用双参数图分析能更好地分辨出每一代细胞, 特别是原代细胞和第一代分裂细胞。

## 功能性染料 - 方案B: 细胞增殖染料 (CPD) eFluor™ 450

### 材料

- CPD eFluor™ 450 (货号 65-0842)
- 无菌1X PBS
- 二甲基亚砜 (DMSO), 无水
- 完全培养基 (含 $\geq 10\%$ 血清)

### 实验步骤

1. 一管CPD eFluor™ 450中加入126  $\mu\text{L}$ 无水DMSO溶解形成10mM染料原液。

**注:** 溶解后, 应避光存放在 $-20^{\circ}\text{C}$ 的条件下, 干燥保存。建议在6个月内使用该染料, 避免反复冻融。

2. 制备需要标记的单细胞悬液。(参见“**流式细胞术的细胞制备方案**”, 第24页)
3. 利用PBS洗涤细胞两次, 清除所有血清。
4. 在PBS (预热至室温) 中重悬细胞, 使浓度达到最终所需的两倍。例如, 最终浓度为 $10 \times 10^6$ 细胞/mL, 则重悬细胞浓度为 $20 \times 10^6$ 细胞/mL。

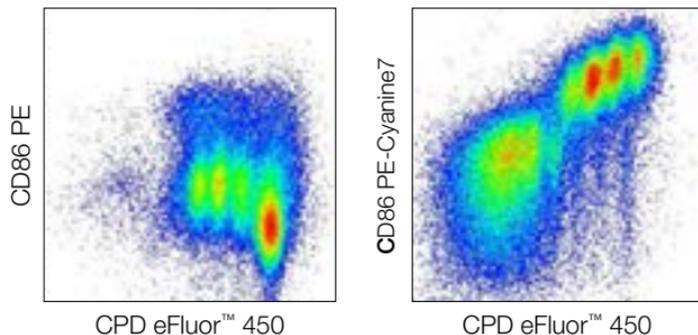
**注:** 最终细胞浓度不应超过 $10 \times 10^6$ 细胞/mL。如果标记细胞总数不超过 $5 \times 10^6$ 细胞/mL, 则使用的PBS不应少于0.5mL。

## 功能性染料 - 方案B: 细胞增殖染料 (CPD) eFluor™ 450

5. PBS (预热至室温) 制备20 $\mu$ M的CPD eFluor™ 450。按照1:1的比例混合CPD工作液和第6步制备的2X细胞悬液。

**注:** 建议将10 $\mu$ M作为标记细胞的起始点; 但是, 强烈建议根据测试结果确定最佳浓度。

6. 涡旋2X细胞悬液, 并加入等量的第5步制备的染料溶液。
7. 室温避光孵育20分钟。
8. 加入4-5体积预冷的完全培养基 (含 $\geq$ 10%血清) 终止标记, 并在冰上孵育5分钟。
9. 用完全培养基洗涤细胞三次。
10. 根据需要进行细胞培养和转移。



### 细胞活化和增殖

**左图:** 利用CPD eFluor™ 450标记人PBMC细胞, 并与刀豆蛋白A (ConA) 溶液 (500X) (货号 00-4978) 一起培养3天。使用抗人CD86 PE (货号 12-0869) 和细胞活性染料FVD eFluor™ 660 (货号 65-0864) 染色。设门淋巴细胞及活细胞后进行分析。

**右图:** 利用CPDeFluor™ 450标记小鼠脾细胞, 并与刀豆蛋白A (ConA) 溶液 (500X) (货号 00-4978) 一起培养3天。使用抗小鼠CD86 PE-Cyanine7 (货号 25-0862) 和细胞活性染料FVD eFluor™ 660 (货号 65-0864) 染色。设门淋巴细胞及活细胞后进行分析。

## 功能染料 - 方案C: 羧基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺脂 (CFSE)

### 材料

- CFSE (货号 65-0850)
- 无菌1X PBS
- 二甲基亚砜 (DMSO), 无水
- 完全培养基 (含 $\geq 10\%$ 血清)

### 实验步骤

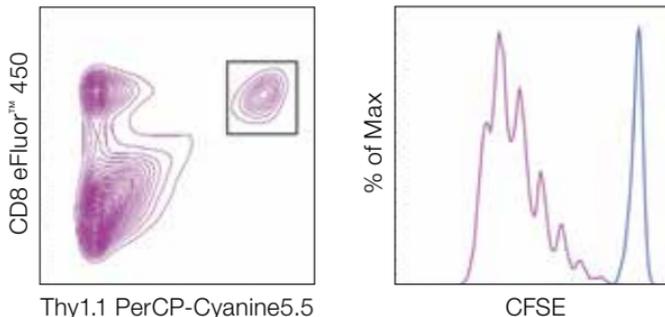
- 90  $\mu\text{L}$  无水DMSO溶解一瓶DMSO成10mM浓缩原液。

**注:** 溶解之后, 应避光存放在 $-20^{\circ}\text{C}$ 的条件下, 干燥保存。建议在6个月内使用该重组染料, 避免反复冻融。

- 制备需要标记的单细胞悬液。(参见“流式细胞术的细胞制备方案”, 第24页)
- 利用PBS洗涤细胞两次, 清除所有血清。
- 使用PBS (预热至室温) 重悬 $5-10 \times 10^6$ 细胞/mL。
- 加入CFSE至所需浓度 (例如: 最终浓度为 $1\mu\text{M}$ 时, 每毫升细胞加入 $0.2\mu\text{L}$  5mM原液)。
- 立即混匀, 并在室温避光孵育10分钟。
- 加入4-5体积预冷的完全培养基终止标记, 并在冰上孵育5分钟。

- 用完全培养基洗涤细胞三次。
- 根据需要进行细胞培养和转移。

**注:** CFSE的浓度、孵育时间和温度可达到理想的染色强度。但是, 荧光信号过强会导致补偿难以调整, 也可能会干扰细胞的功能。因此, 强烈建议根据测试结果确定最佳浓度。



### 细胞增殖对OVA处理的反应

利用 $1\mu\text{M}$  CFSE标记OT-I小鼠的淋巴细胞, 打入C57Bl/6小鼠体内。三天以后, 利用抗小鼠/大鼠CD90.1 (Thy1.1) PerCP-Cyanine5.5 (货号 45-0900) 和抗小鼠 CD8a eFluor™ 450 (货号 48-0081) 染色小鼠脾细胞, 为OT-I细胞设门 (左图)。分析OT-I门内(CD8+Thy1.1+)细胞的分裂 (右图), OVA免疫小鼠测定出离散的CFSE峰值 (紫色直方图), 而PBS免疫小鼠的未分化细胞为单独明亮的CFSE峰值 (蓝色直方图)。

## DNA标记和活性（死/活）染料

活性染料					
染料	激发器	发射光	功能	优点	局限性
<b>紫外激光</b>					
细胞活性染料FVD eFluor™ 455UV	350nm	455nm	标记凋亡细胞	标记出死细胞，将死细胞从分析中排除，甚至在流式细胞术分析细胞内蛋白。	不能与Indo-1 (蓝色), DAPI或Hoechst配合使用。
Calcein Blue AM	360nm	445nm	标记活细胞	在流式细胞技术中识别存活细胞。 由紫外激光器激发。 以非荧光物进入活细胞内，细胞内的酯酶将其转换为荧光染料。 测定活细胞内酯酶的活性。 不会保留在细胞膜受损的死细胞内。	固定或破膜之后不会保留在细胞内，因此不适合并用细胞内的染色方案。
<b>紫色激光</b>					
细胞活性染料FVD eFluor™ 450	405nm	450nm	标记凋亡细胞	标记出死细胞，将死细胞从分析中排除，并可同时分析细胞内蛋白。	不能与Pacific Blue™或eFluor™ 450 配用。
细胞活性染料FVD eFluor™ 506		506nm			不能与AmCyan或eFluor™ 506配用。

## DNA标记和活性（死/活）染料

活性染料					
染料	激光器	发射光	功能	优点	局限性
<b>紫色激光</b>					
Calcein Violet AM	408nm	450nm	标记活细胞	<p>在流式细胞技术中识别活细胞。</p> <p>由紫外激光器激发。</p> <p>以非荧光物进入活细胞，细胞内的酯酶将其转换为荧光染料。</p> <p>测定活细胞内酯酶的活性。</p> <p>不会保留在细胞膜受损的死细胞内。</p>	<p>固定或破膜之后不会保留在细胞内，因此不适用于细胞内的染色方案。</p> <p>不能与Pacific Blue™或eFluor™ 450并用。</p>
<b>蓝色激光</b>					
细胞活性染料FVD eFluor™ 520	488nm	522nm	标记凋亡细胞	<p>标记死细胞，将死细胞从分析中排除，并可在流式细胞术同时分析细胞内蛋白。</p>	<p>不能与FITC, Alexa Fluor™ 488或GFP配用。</p> <p>固定或破膜之后不会保留在细胞内，因此不适合并用细胞内的染色方案。</p>
碘化丙啶		617nm		<p>在流式细胞分析中排除死细胞。</p> <p>经过破坏的细胞膜进入细胞，并与dsDNA/RNA结合。</p> <p>不能通过完好的细胞膜。</p> <p>也可用于DNA倍数/细胞生命周期分析。</p>	

## DNA标记和活性（死/活）染料

活性染料					
染料	激光器	发射光	功能	优点	局限性
<b>蓝色激光</b>					
7-ADD	548nm	647nm	标记死细胞	<p>在流式细胞分析中排除死细胞。</p> <p>经过破坏的细胞膜进入细胞，并与dsDNA结合。</p> <p>不能通过完好的细胞膜。</p> <p>也可用于DNA倍数/细胞生命周期分析。</p>	固定或破膜之后不会保留在细胞内，因此不适宜并用细胞内的染色方案。
Calcein AM	495nm	515nm	标记活细胞	<p>在流式细胞技术中识别活细胞。</p> <p>由紫外激光器激发。</p> <p>以非荧光物进入存活细胞，细胞内的酯酶将其转换为荧光染料。</p> <p>测定活细胞内酯酶的活性。</p> <p>不会保留在细胞膜受损的死细胞内。</p>	<p>固定或破膜之后不会保留在细胞内，因此不适宜并用细胞内的染色方案。</p> <p>高浓度时对PE, PerCP-Cyanine5.5和PE-Cyanine7通道需进行大幅补偿调节。</p> <p>需要与膜联蛋白, 7-AAD或碘化丙啶共同染色，以便区分死/活细胞。</p> <p>不能与FITC, Alexa Fluor™ 488或GFP并用。</p>

## DNA标记和活性（死/活）染料

活性染料					
染料	激光器	发射光	功能	优点	局限性
<b>红色激光</b>					
细胞活性染料FVD eFluor™ 660	633nm	660nm	标记死 细胞	标记死细胞，将死细胞从分析中排除，并可同时分析 细胞内蛋白。	不能与APC或eFluor™ 660并用。
细胞活性染料FVD eFluor™ 780		780nm			不能与APC-eFluor™ 780或APC- Cyanine7并用。

## 标记活细胞的DNA

CyTRAK™ Orange和DRAQ5™是与双链DNA具有高度亲和力的葱醌染料。可以穿透细胞膜，因此用来标记活细胞、死细胞或固定后细胞中的DNA。该染料在流式细胞术中用于区分有核与无核细胞。荧光显微镜下，它们用于识别细胞核的位置。

### 材料

- CyTRAK 橙色 (货号 65-0881)或DRAQ5 (货号 65-0880)
- 细胞培养基或其他缓冲液
- 流式细胞染色缓冲液(货号 00-4222)
- 12x75mm流式管

1. 制备单细胞悬液。详情参见“[流式细胞术的细胞制备方案](#)”（第24页）。
2. [可选]染色细胞的表面蛋白。详细说明参见“[细胞表面蛋白染色, 方案A](#)”（第51页）。
3. 用细胞培养基或其他缓冲液洗涤细胞，然后用培养基或其他缓冲液，将细胞重悬为 $1 \times 10^7$ 细胞/mL。

**注：**避免使用含叠氮化钠的缓冲液。

4. 向细胞中加入CyTRAK Orange或DRAQ5，使其终浓度达到2-10 $\mu$ M。并在室温或37°C下孵育10-30分钟。注意避光。

**注：**最佳浓度和标记条件应该进一步优化，以获得最佳检测性能。

5. 加入2mL流式细胞染色缓冲液，室温下400–600 $\times$ g离心5分钟，弃上清。
6. 在适量的流式细胞染色缓冲液中重悬细胞。
7. 使用流式细胞仪分析样本。

### 实验步骤

## 细胞活性染料 - 概述

确认细胞是否存活是流式细胞实验中的关键环节。死细胞会与抗体非特异性结合，而影响数据的准确性。因此，必须从分析中排除死细胞的影响。

### 活细胞（未固定）的活性染料染色

- 制备单细胞悬液
- 用荧光直标抗体染色表面抗原（30分钟）
- 用流式细胞染色缓冲液洗涤（1-2x5分钟）
- 与活性染料一起孵育（10-15分钟）
- 如果使用钙黄绿素染料，则用流式细胞染色缓冲液洗涤（1-2x5分钟）
- 如果使用碘化丙啶或7-AAD，不需洗涤。
- 利用流式细胞仪分析细胞

### 活细胞或固定后细胞的活性染料染色

- 利用直标抗体染色表面抗原之前或之后，用PBS洗涤细胞（2x5分钟）
- 与细胞活性染料一起孵育（30分钟）
- 用流式细胞染色缓冲液洗涤（1-2x5分钟）
- 如实验需要，继续固定、破膜和/或细胞内染色
- 利用流式细胞仪分析细胞

## 活性染料 - 方案A：用PI或7-AAD染色死细胞

PI和7-AAD可用于染色死细胞，标准的细胞表面染色分析中用来排除死细胞。该染料不能通过完好的细胞膜，但可通过已破坏的细胞膜进入胞内。PI进入死细胞后，嵌入双链DNA或双链RNA中，而7-AAD则优先嵌入双链DNA。因为该嵌合使非共价结合，所以重悬细胞用的缓冲液中必须含有该染料，以保证死细胞被染色。

**注：**PI和7-AAD均不适用于胞内染色。关于与细胞内染色方案相容的活性染料相关信息，请参见第98页“**细胞活性染料 (FVD) 染色凋亡细胞, 方案C**”。

### 材料

- 活性染料
  - PI染料(货号 00-6990)
  - 7-AAD活性染料(货号 00-6993)
- 流式细胞染色缓冲液(货号 00-4222)
- 12x75mm流式管

### 实验步骤

1. 染色细胞的表面抗原之后，用流式细胞染色缓冲液洗涤细胞1-2次。
2. 在适量的流式细胞染色缓冲液中重悬细胞。
3. 每100 $\mu$ L细胞中加入5 $\mu$ L PI或7-AAD染色液。
4. 在冰上或室温下孵育5-15分钟。切勿洗涤细胞。

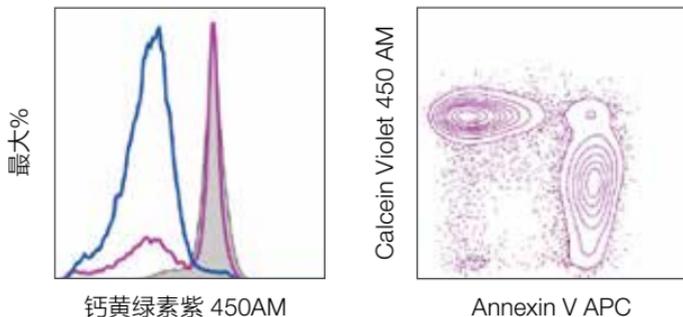
**注：**在实验过程中，缓冲液内必须含有PI或7-AAD。加入PI或7-AAD后切勿洗涤细胞。

5. 使用流式细胞仪分析样本。

**注：**应在孵育后4小时内进行分析，因为细胞长期保留在PI或7-AAD之中，会造成细胞死亡。在2-8°C下避光存放，直到分析。

## 活性染料 -方案B：用钙黄绿素染料染色活细胞

钙黄绿素AM、钙黄绿素紫 450AM和钙黄绿素蓝AM可轻易穿透细胞膜，选择性标记活细胞，适用于流式细胞分析或荧光显微分析；而细胞膜破坏的死细胞不能保留钙黄绿素。如要精准分辨出死活细胞群，建议同时使用Annexin V或7-AAD染色。



### 紫激光激发下的钙黄绿素紫450 AM

室温下用1 $\mu$ M 钙黄绿素紫450 AM (货号 65-0854)染色Balb/c胸腺细胞(左图)。将胸腺细胞置于冰上过夜(带有阴影的直方图)，或者在对照(紫色直方图)或加入(蓝色直方图)1 $\mu$ M地塞米松的条件下37 $^{\circ}$ C温度下过夜孵育。对照胸腺细胞培养一夜后用Annexin V APC (货号 88-8007)染色，可以进一步区分死活细胞(右图)。所有细胞都用于分析。

### 一般注释

- 钙黄绿素染料为冻干粉末，使用前需用无水DMSO回溶。回溶后应在短时间内使用。如需短期贮藏，应保存在-20 $^{\circ}$ C下并使用干燥剂。避免反复冻融，开瓶前应恢复至室温。
- 钙黄绿素染色在抗体表面染色之前或之后均可进行。我们建议研究者根据开展的实验测试优化，获得最佳实验结果。由于钙黄绿素无法保留在细胞膜破坏的细胞中，因此不适用于细胞内染色方案。关于细胞内染色方案相容的活性染料染色死细胞的信息，请参见第98页。

## 活性染料 -方案B：用钙黄绿素染料染色活细胞

### 材料

- 钙黄绿素染料
  - 钙黄绿素AM (超纯净级) (货号 65-0853)
  - 钙黄绿素紫450 AM(货号 65-0854)
  - 钙黄绿素蓝AM(货号 65-0855)
- 无水DMSO
- [可选]PI (货号 00-6990)或7-AAD (货号 00-6993)
- 流式细胞染色缓冲液(货号 00-4222)
- 12x75mm圆底离心管

### 实验步骤

1. 准备单细胞悬液。
2. 在流式细胞染色缓冲液 (0.1–1 mL) 中重悬细胞, 浓度为 $1-5 \times 10^6$ 细胞/mL。
3. 加入建议浓度的钙黄绿素染料并混匀。(有关钙黄绿素染料的推荐浓度范围, 参见产品说明)

**注:** 根据实验情况, 可以使用流式细胞染色缓冲液或PBS制备稀释的工作液。

4. 室温下孵育30分钟, 注意避光。
5. 加入2mL流式细胞染色缓冲液, 并在室温、400–600 x g下离心5分钟, 弃上清。
6. 重复第5步。
7. [可选]染色细胞的表面蛋白。详细说明参见“**细胞表面蛋白染色, 方案A**”(第51页)。
8. 使用流式细胞仪分析样本。

## 活性染料 -方案C：用FVD染色凋亡细胞

### 引言

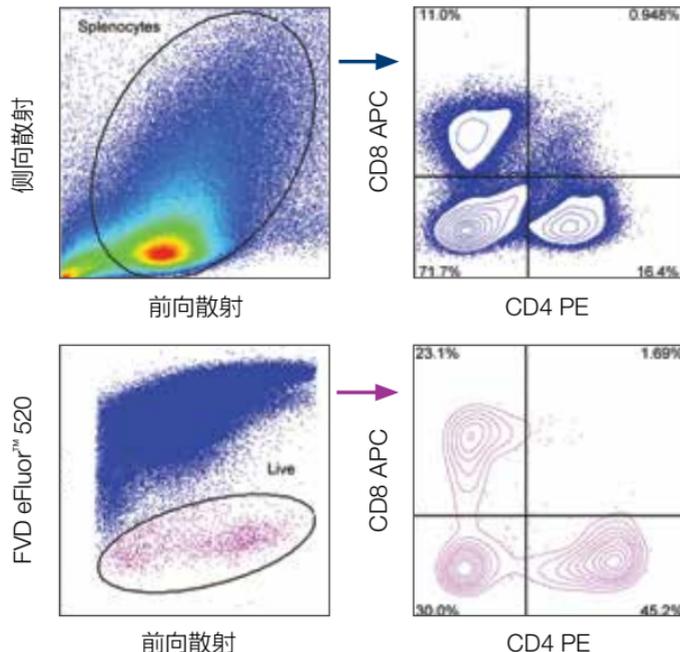
FVD细胞活性染料 (FVD) 能对细胞膜破坏的细胞进行染色, 通过共价键与细胞内的蛋白交联, 不可逆地结合到所有物种的死细胞内。细胞染色后经过冷冻保存、固定和破膜处理染色结果不受影响, 确保后续分析中排除死细胞的影响, 提高数据质量。FVD的颜色范围广泛, 紫外线、紫色、蓝色和红色激光皆有。完整产品列表请参见第89页。

## 活性染料染色-方案C：使用可固定的活性染料（FVD）染色死细胞

### 一般注意事项

#### 使用FVD的最佳方法

- FVD是用高质量无水DMSO稀释的溶液。应该避光 $\leq -70^{\circ}\text{C}$ 温度下防潮贮藏。该产品可反复冻融最多20次。
- 使用FVD前需恢复至室温。
- 为达到最佳的染色，最好在不含叠氮化物和蛋白质的PBS中使用FVD染色。
- 可以在表面蛋白染色之前或之后用FVD染色细胞。FVD染色后的细胞可以冷冻保存，用于后续分析。建议研究者根据不同实验条件优化最佳浓度。
- FVD可与固定、破膜和细胞内染色兼容使用。FVD也可以用于未固定的细胞染色。
- 如需补偿调节时，建议使用FVD单染管来调节。
- 如果预估死细胞不足5%，建议取少量细胞在 $65^{\circ}\text{C}$ 下加热1分钟，立即置于冰上1分钟。经处理后，高温致死细胞可以与活细胞按1 : 1的比例混合，然后用FVD染色。



#### 活性染料的重要性

用ConA刺激小鼠脾细胞4天。上图：根据前向和侧向散设门圈出全部细胞用于分析CD4和CD8指标。下图：根据FVD eFluor™ 520对活细胞设门，然后进行CD4和CD8分析，可以明显看到排除死细胞干扰后数据更准确。

## 活性染料 - 备选方案 ( 方案C3-C5 )

### 一般注意事项

- 为使用方便对方案C3, C4和C5进行优化, 但可能会导致死细胞染色效果降低。如果要获得最佳染色结果, 不建议使用此备选染色方案。建议研究者评估此优化方案是否具有良好的染色结果。
- FVD可以染色未裂红的全血细胞。详见“**方案C3**”(第102页)
- 可以在不含叠氮化物但含蛋白质的PBS中染色。这种方法会导致凋亡细胞染色效果降低。详见“**方案C4**”(第102页)。
- 也可以在含叠氮化物和蛋白质的PBS中染色, 如流式细胞染色缓冲液 (货号 00-4222)。但这种方法也可能导致细胞染色程度显著下降或活细胞染色背景增加。详见“**方案C4**”(第102页)。
- 可以将FVD加入抗体混合液中一起与细胞孵育。在细胞染色前, FVD不宜在抗体混合液中停留较长时间。最好用不含叠氮化物且含蛋白质的缓冲液稀释抗体和FVD。详见“**方案C5**”(第103页)。

## 活性染料 -方案C1： 12x75mm流式管内的标准染色

### 材料

- 磷酸缓冲盐溶液 (PBS), 不含叠氮化物和蛋白质
- 流式细胞染色缓冲液(货号 00-4222)
- 12 x 75 mm流式管

### 实验步骤

1. 在12 x 75 mm流式管中准备细胞。
2. 在不含叠氮化物和血清/蛋白质的PBS中洗涤细胞2次。
3. 在不含叠氮化物和蛋白质的PBS中重悬细胞至 $1-10 \times 10^6/\text{mL}$ 。

**注:** 为了保持细胞染色的一致性, 不建议对体积不足0.5mL的样本进行染色。

4. 向每毫升细胞中加入 $1\mu\text{L}$  FVD并立即涡旋。
5. 在 $2-8^{\circ}\text{C}$ 下孵育30分钟, 避光。
6. 用流式细胞染色缓冲液或同类溶液洗涤细胞1-2次。
7. 按需继续实验。

## 活性染料 -方案C2： 96微孔板内的染色

### 材料

- 磷酸缓冲盐溶液 (PBS), 不含叠氮化物和蛋白质
- 流式细胞染色缓冲液(货号 00-4222)
- 96孔板

### 实验步骤

1. 在96孔板中制备适量的单细胞悬液。
2. 在不含叠氮化物和血清/蛋白质的PBS中洗涤细胞2次。去掉上清液。
3. 用不含叠氮化物和血清/蛋白质的PBS, 按照1:1000的比例稀释FVD, 制备工作原液。每孔需要 $100\mu\text{L}$ 的用量。以96孔板为例, 将 $10\mu\text{L}$  FVD加入 $10\text{mL}$  PBS中。
4. 每个微孔中加入 $100\mu\text{L}$ 工作原液, 并立即混匀。
5. 在 $2-8^{\circ}\text{C}$ 下孵育30分钟, 避光。
6. 用流式细胞染色缓冲液或同类溶液洗涤细胞1-2次。
7. 按需继续实验。

## 活性染料 -方案C3：用FVD染色未裂解的全血细胞

### 材料

- 流式细胞染色缓冲液(货号 00-4222)
- 红细胞裂解液, 例如
  - 1X红细胞裂解液(货号 00-4333),
  - 10X红细胞裂解液 (多物种) (货号 00-4300)或
  - 一步法固定/裂解液 (10X) (货号 00-5333)
- 12 x 75 mm流式管

### 实验步骤

1. 将未裂解的全血加入12 x 75 mm流式管内。
2. 向100 $\mu$ L全血中加入1 $\mu$ L FVD。
3. 加入FVD后, 加入其他表面染色抗体。

**注:** 或者按照每份样本1 $\mu$ L的比例, 将FVD直接加入表面染色抗体混合物中进行染色。混合液应该在加入全血样本之前制备。

4. 在2-8 $^{\circ}$ C下孵育30分钟; 避光。
5. 用流式细胞染色缓冲液洗涤细胞1-2次。
6. 按需裂解红细胞并继续实验。

## 活性染料 -方案C4：在含叠氮化物和/或含蛋白质的缓冲液中使用FVD染色

### 材料

- 流式细胞染色缓冲液(货号 00-4222)
- 12 x 75 mm流式管

### 实验步骤

1. 在12 x 75 mm流式管中用流式细胞染色缓冲液制备细胞悬液, 浓度达到1-10 $\times 10^6$ /mL。
2. 向每毫升细胞中加入1 $\mu$ L FVD并立即涡旋。
3. 在2-8 $^{\circ}$ C下孵育30分钟, 避光。
4. 用流式细胞染色缓冲液洗涤微孔1-2次。
5. 按需继续实验。

## 活性染料 -方案C5：在抗体混合物中加入FVD染料

### 材料

- 磷酸缓冲盐溶液 (PBS), 不含叠氮化物和蛋白质
- 流式细胞染色缓冲液(货号 00-4222)
- 12 x 75 mm流式管

### 实验步骤

1. 在12x75 mm流式管中制备细胞, 浓度为 $1-10 \times 10^6/100\mu\text{L}$ 缓冲液(参见下面的注释)。

**注:** 为了使FVD达到最佳染色效果, 可以在不含叠氮化物和血清/蛋白质的PBS中悬浮细胞(参见“**方案C1: 在12x75mm流式管中的标准染色**”[第101页])。如果测试后并不影响结果判断, 可以使用流式细胞染色缓冲液悬浮细胞(“**方案C4: 在含叠氮化物和/或含蛋白质的缓冲液中用FVD染色**”[第102页])。

2. 在流式细胞染色缓冲液中制备所需的抗体混合液。
3. 在抗体加入细胞之前, 将FVD加入抗体混合液, 比例为每份样本0.5-1 $\mu\text{L}$ 。
4. 向细胞样本中加入FVD/抗体混合物。
5. 在2-8°C下孵育30分钟, 避光。
6. 用流式细胞染色缓冲液洗涤细胞1-2次。
7. 按需继续实验。

## 钙离子染料 - 方案：钙离子染料eFluor™ 514和Indo-1 AM

### 钙离子染料染色方案概述

我们可以利用荧光显微镜、流式细胞术、分光光度计和荧光酶标仪，通过可穿透细胞膜的染料，监控细胞内游离钙的浓度变化，例如eFluor™ 514和Indo-1 AM钙离子敏感染料。

钙离子染料eFluor™ 514被488nm激光激发后，会发射出波长为520nm的荧光。与Fluo-3和Fluo-4相比，即使在室温下它也能增加细胞的吸收和维持亮度。

Indo-1AM是单激光激发/双发射波长的Ca<sup>2+</sup>指示剂。未结合Indo-1的发射峰值为485nm，与Ca<sup>2+</sup>结合后移至410nm。流式细胞术可以测量出随时间发生荧光偏移，用两种发射波长比例来表示。

### 材料

- 钙离子染料
  - 钙离子染料eFluor™ 514(货号 65-0859)
  - Indo-1 AM钙离子染料(货号 65-0856)
  - Indo-1AM(高度纯化级)(货号 65-0857)
- 无水DMSO
- 12x75mm流式管

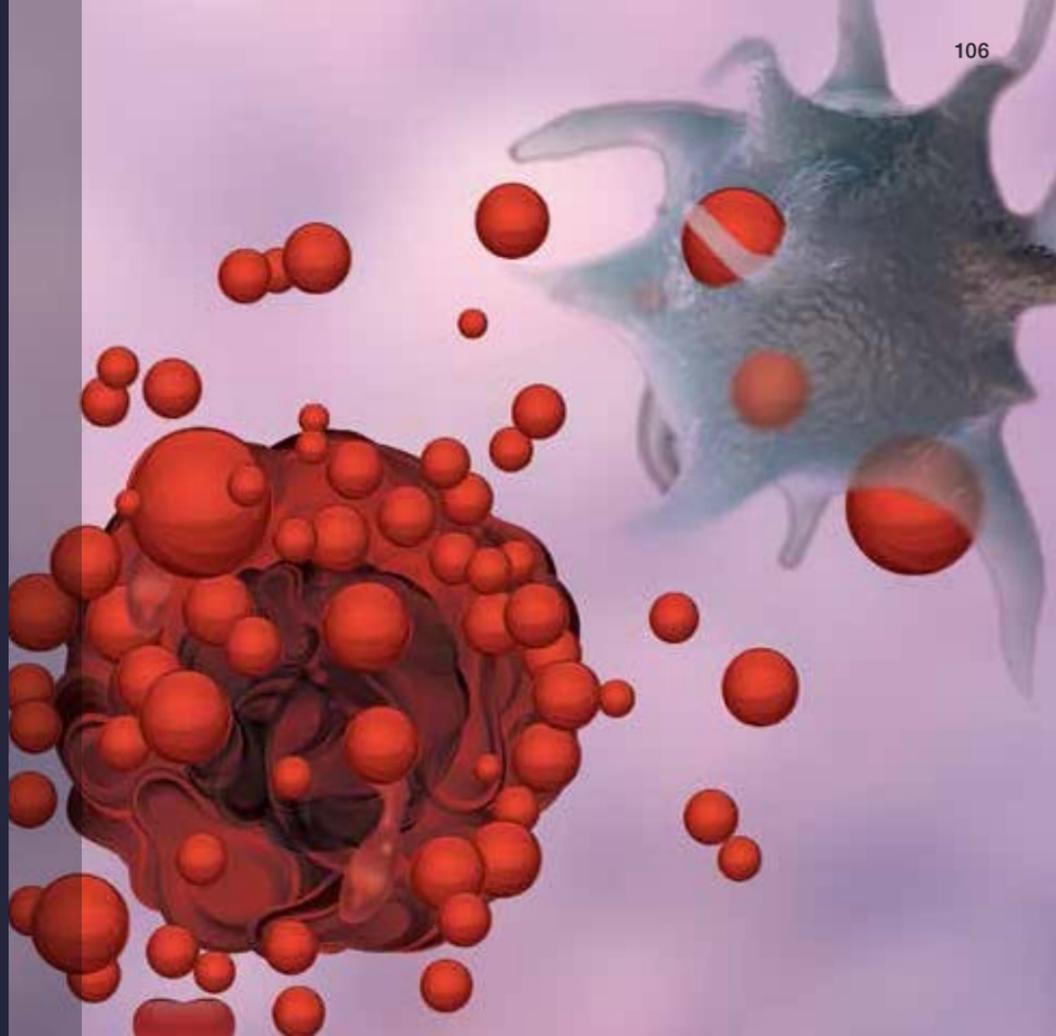
### 实验步骤

1. 用无水DMSO重溶钙离子染料。染料重组之后必须避光贮藏。贮藏在≤ -20°C的温度中，避免反复冻融。
  - 钙离子染料eFluor 514为2-5nM
  - Indo-1 AM为1mM
2. 制备单细胞悬液。详情参见“[流式细胞术的细胞制备方案](#)”(第24页)。
3. [可选]染色细胞的表面蛋白。详细说明参见“[细胞表面蛋白染色, 方案A](#)”(第51页)。
4. 向细胞加入钙离子染料
  - 钙离子染料eFluor™ 514建议使用4-5μM
  - Indo-1AM建议使用0.1-1μM

**注:**建议优化最佳浓度和标记条, 以获得最佳检测性能。

5. 使用流式细胞仪分析样本。

钙离子染料					
染料	激发光	发射光	功能	优点	限制
eFluor™ 514钙离子染料	490 nm	514 nm	荧光强度根据结合的游离Ca <sup>2+</sup> 的增加而增加。	定性/半定量测定细胞中的游离Ca <sup>2+</sup> 。 兼容流式细胞技术、荧光显微镜、酶标仪和分光光度计。 与Fluo-3或Fluo-4相比, 细胞更容易吸收, 且更明亮	仅半定量。
Indo-1 AM	346 nm	410 nm (结合) 485 nm (未结合)	发射波长根据结合的游离Ca <sup>2+</sup> 的增加而降低。	定量测定游离Ca <sup>2+</sup> 。 兼容流式细胞技术、荧光显微镜、酶标仪和分光光度计。 可进行比率测量	很难对结合/未结合发射波长进行补偿。 与eFluor™ 450, 或其他紫色激光激发的染料不兼容。

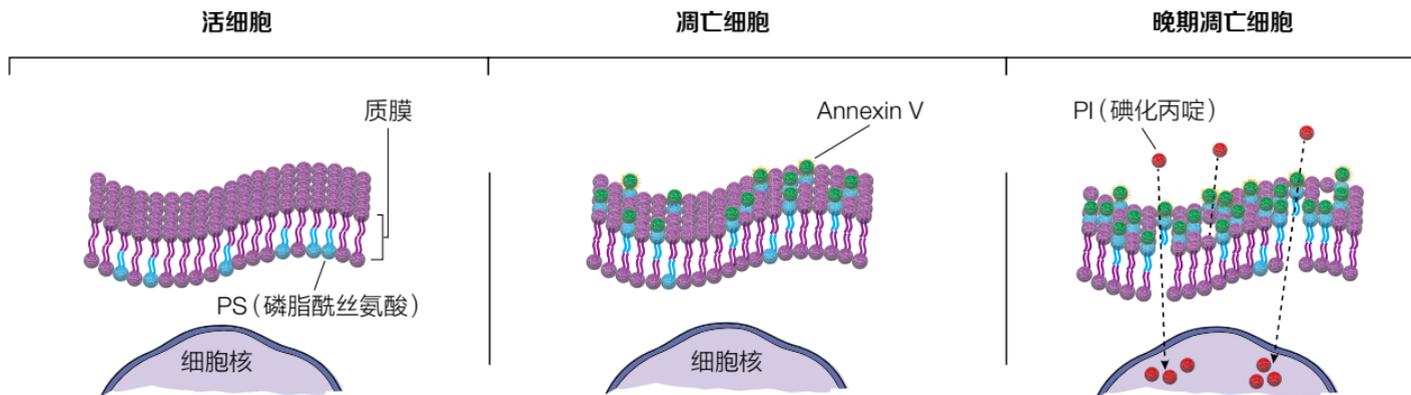


## 流式细胞术检测细胞凋亡

- JC-1染料测定线粒体膜电位 . . . . . 109
- Annexin V染色 . . . . . 110
  - 方案A: Annexin V染色 . . . . . 112
  - 方案B: Annexin V染色与FVD染色 . . . . . 113
  - 方案C: Annexin V染色与表面和细胞内蛋白染色 . . . . . 114

## 流式细胞术检测细胞凋亡

细胞凋亡的特点是细胞特征的改变, 包括DNA降解、线粒体膜电位下降、细胞膜上脂质的不对称分布被破坏。这些变化都可以利用对其具有敏感性和特异性的染料和试剂, 通过流式细胞仪检测。



## JC-1染料测定线粒体膜电位

JC-1是测定因细胞凋亡或正常细胞受到外在压力导致线粒体膜电位改变的重要指示剂。在正常的细胞中，JC-1聚集在线粒体内，显示为红色荧光（发射光为590nm）。在凋亡细胞中，线粒体膜电位改变阻止染料聚集，导致JC-1单体散落在胞浆中，发出绿色荧光（发射光为529nm）。这种红光变为绿光的特性就被利用到流式细胞术和荧光显微镜中成为细胞凋亡的指标。

### 材料

- JC-1线粒体膜电位染料(货号 65-0851)
- 无水DMSO
- 细胞培养基
- 1X PBS
- 12x75mm流式管

### 实验步骤

1. 使用无水DMSO将JC-1重溶为1 mg/mL。染料重溶后必须避光贮藏在 $\leq -20^{\circ}\text{C}$ 。避免反复冻融。
2. 制备单细胞悬液。详情参见“**流式细胞术的细胞制备方案**”（第24页）。
3. [可选]细胞表面蛋白染色。详细说明参见“**细胞表面蛋白染色，方案A**”（第51页）。
4. 在细胞培养基中重悬细胞至 $1 \times 10^6/\text{mL}$ ，然后每毫升细胞中加入 $2.5\mu\text{L}$ 的JC-1，涡旋，室温下孵育10分钟。

**注：**浓度和标记条件应该由研究者优化，以获得最佳检测性能。

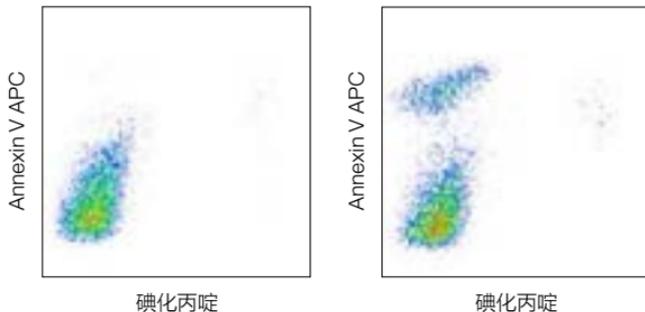
5. 添加2mL流式细胞染色缓冲液，并在室温下 $400-600\times g$ 离心5分钟。弃上清。
6. 重复第5步。
7. [可选]用Annexin V染色细胞。详情参见“**Annexin V染色方案**”（第110页）。
8. 使用流式细胞仪分析样本。

## Annexin V染色

### 引言

Annexins是与磷脂酰丝氨酸 (PS) 结合力很高的钙依赖磷脂结合蛋白。PS在正常生理条件下主要位于细胞质膜的内面。细胞凋亡开始后, PS在磷脂双分子层上的不对称分布被破坏, 转移至细胞膜的外面, 因此形成细胞自我吞噬作用。PS一旦位于细胞膜的外表面, 就会被荧光标记的Annexin V结合上。

- 在细胞凋亡早期, 一些细胞膜活性染料, 例如碘化丙啶 (PI) 和 7-AAD无法进去细胞膜, FVD染料, 例如eFluor™ 660、506和 eFluor™ 780染色效果不佳。此类细胞只能被Annexin V染色, 而不能被染DNA的细胞活性染料染色, 因此可用来区分早期凋亡的细胞。
- 在细胞凋亡晚期, 细胞膜失去完整性, Annexin V能通过PS进入到细胞内部。
- 染DNA的细胞活性染料可以用来区分凋亡晚期和坏死细胞 (Annexin V染色阳性; DNA活性染料染色阳性) 与凋亡早期的细胞 (Annexin V染色阳性; DNA活性染料染色阴性)。



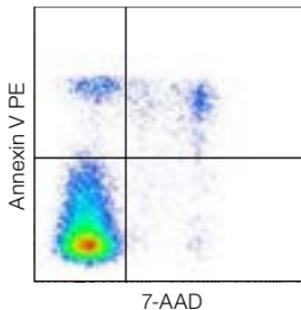
**Annexin V+ PI-的细胞群中含有凋亡早期的细胞**  
 未经过处理 (左图) 或经过10 $\mu$ M喜树碱处理4小时 (右图) 的Jurkat细胞使用Annexin V细胞凋亡检测试剂盒染色。

## Annexin V染色 - 概述

- 将结合缓冲液稀释为1X
- [可选]FVD染色细胞 (30分钟)
- [可选]用荧光标记抗体染色表面抗原 (30分钟)
- 用结合缓冲液洗涤 (1x5分钟)
- 加入荧光结合的Annexin V, 在室温下孵育 (10-15分钟)。
- 结合缓冲液洗涤 (1x5分钟)
- [可选]固定细胞并破膜 (30分钟)
- [可选]用荧光标记抗体染色细胞内抗原 (30分钟)
- 流式细胞仪分析细胞

### 一般注释

- FVD eFluor™ 450不建议与Annexin V细胞凋亡检测试剂盒同时使用。
- 由于Annexin V与PS的反应具有钙依赖性, 因此在Annexin V检测过程中, 避免使用含EDTA或其他钙螯合剂的缓冲液, 这一点非常关键。
- Annexin V只能在正常质膜完好的情况下成为细胞凋亡的标记物。如果质膜不好, 会导致Annexin V与细胞内的PS结合而有假阳性的结果。



### Annexin V PE细胞凋亡检测试剂盒

将小鼠胸腺细胞制成单细胞悬液, 并在37°C下过夜孵育, 然后检测凋亡细胞群。收集细胞并用Annexin V PE细胞凋亡检测试剂盒染色 (货号 88-8102)。

## 方案A: Annexin V染色

### 材料

- 12x75mm流式管
- 1X PBS
- Annexin V细胞凋亡检测试剂盒 (cat. nos. 88-8103, 88-8007, 88-8006, 88-8005, 88-8102, or 88-8008)
- 10X结合缓冲液
- 分别与PE-Cyanine7, APC, eFluor™ 450, FITC, PE, 或PerCP-eFluor™ 710结合的Annexin V (参见检测试剂盒产品列表)。
- PI(货号 00-6990)或7-AAD活性染料(货号 00-6993)

**注:** 货号 88-8008中不包含活性染料。我们建议与FVD eFluor™ 660 (货号 65-0864), FVD eFluor™ 506 (货号 65-0866), 或FVD eFluor™ 780 (货号 65-0865)配合使用。

### 实验步骤

1. 将1体积10X反应缓冲液与9体积蒸馏水混合, 制备1X结合缓冲液。
2. 收集细胞。
3. 用1X PBS洗涤细胞一次, 然后用1X结合缓冲液洗涤一次。
4. 用1X结合缓冲液重悬细胞至 $1-5 \times 10^6$ 细胞/mL。
5. 向100 $\mu$ L单细胞悬液中加入5 $\mu$ L荧光染料结合的Annexin V。
6. 室温下孵育10-15分钟, 注意避光。
7. 加入2mL 1X结合缓冲液, 并在室温400–600xg下离心5分钟, 弃上清。
8. 在200 $\mu$ L 1X结合缓冲液中重悬细胞。
9. 加入5 $\mu$ L PI或7-AAD活性染料, 然后在冰上或室温下孵育5-15分钟。

**注:** 在数据采集过程中, 缓冲液内必须存在碘化丙啶或7-AAD。加入PI或7-AAD后切勿洗涤细胞。

10. 使用流式细胞仪分析样本。

**注:** 细胞应该在孵育后4小时内进行分析, 因为细胞长期保留在PI或7-AAD之中, 会对细胞存活度造成影响。在2–8°C下避光存放, 直到用于分析。

## 方案B: Annexin V染色和FVD染色

### 材料

- 12x75mm流式管
- PBS (不含叠氮化物和不含血清/蛋白质的PBS)
- Annexin V细胞凋亡检测试剂盒 (cat. nos. 88-8007, 88-8006, 88-8005, 88-8102, 或88-8008)
- 10X结合缓冲液
- 分别与APC, eFluor™ 450, FITC, PE, PE-Cyanine7或PerCP-eFluor™ 710结合的Annexin V (参见检测试剂盒的产品货号)。
- 流式细胞染色缓冲液(货号 00-4222)
- PBS (不含叠氮化物和不含血清/蛋白质的PBS)
- FVD eFluor™ 660 (货号 65-0864), FVD eFluor™ 506 (货号 65-0866), 或FVD eFluor™ 780 (货号 65-0865)。

**注:** FVD eFluor™ 450不建议与Annexin V细胞凋亡检测试剂盒一起使用。

### 实验步骤

1. 将1体积10X反应缓冲液与9体积蒸馏水混合, 制备1X反应缓冲液。
2. 用不含叠氮化物和不含血清/蛋白质的PBS中洗涤细胞两次。
3. 在不含叠氮化物和不含血清/蛋白质的PBS中重悬细胞至 $1-10 \times 10^6$ 细胞/mL。
4. 每毫升细胞中加入1 $\mu$ L FVD并立即涡旋。
5. 2-8°C下孵育30分钟, 避光。
6. 用流式细胞染色缓冲液或等同溶液洗涤细胞两次。
7. 用1X结合缓冲液洗涤细胞一次。
8. 用1X结合缓冲液重悬细胞至 $1-5 \times 10^6$ 细胞/mL。
9. 向100 $\mu$ L单细胞悬液中加入5 $\mu$ L荧光结合的Annexin V。
10. 室温下孵育10-15分钟。注意避光。
11. 加入2mL 1X结合缓冲液, 并在室温400-600 x g下离心5分钟, 弃上清。
12. 在200 $\mu$ L 1X结合缓冲液中重悬细胞。
13. 使用流式细胞仪分析样本。

## 方案C: Annexin V染色和表面与细胞内蛋白染色

### 材料

- 12x75mm流式管
- 1X PBS (不含叠氮化物和不含血清/蛋白质)
- 流式细胞染色缓冲液(货号 00-4222)
- Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set(货号 00-5523)或 Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set(货号 88-8824)
- Annexin V细胞凋亡检测试剂盒 (货号88-8103, 88-8007, 88-8006, 88-8005, 88-8102, 或 88-8008)
- 10X结合缓冲液
- 分别与PE-Cyanine7, APC, eFluor™ 450, FITC, PE, 或PerCP-eFluor™ 710结合的Annexin V (参见检测试剂盒的产品货号)。
- FVD eFluor™ 660 (货号 65-0864), FVD eFluor™ 506 (货号 65-0866), 或FVD eFluor™ 780 (货号 65-0865)。

**注:** FVD eFluor™ 450不建议与Annexin V细胞凋亡检测试剂盒一起使用。

### 实验步骤

1. 将1体积10X方应缓冲液与9体积蒸馏水混合, 制备1X方应缓冲液。
2. 染色细胞表面抗原。详细说明参见“**细胞表面蛋白染色, 方案A**”(第51页)。
3. 用不含叠氮化物和不含血清/蛋白质的PBS中洗涤细胞两次。
4. 在不含叠氮化物和不含血清/蛋白质的PBS中重悬细胞至 $1-10 \times 10^6$ 细胞/mL。
5. 每毫升细胞内加入 $1\mu\text{L}$ FVD活性染料, 并立即混合。
6.  $2-8^\circ\text{C}$ 下孵育30分钟, 避光。
7. 用流式细胞染色缓冲液或等同溶液洗涤细胞两次。
8. 用1X结合缓冲液洗涤细胞一次。
9. 用1X结合缓冲液重悬细胞至 $1-5 \times 10^6$ 细胞/mL。
10.  $100\mu\text{L}$ 单细胞悬液中加入 $5\mu\text{L}$ 荧光结合的Annexin V。
11. 室温下孵育10-15分钟, 注意避光。
12. 用1X结合缓冲液洗涤细胞一次。
13. 染色细胞内抗原。详见“**染色细胞内蛋白, 方案A或B**”(第64或66页)。
14. 使用流式细胞仪分析样本。

## 问题排除

- 无染色/弱染色 . . . . . 116
- 背景值高/非特异性染色 . . . . . 120
- 染色结果异常. . . . . 121

## 问题排除

无染色/弱染色	
一般情况	
可能原因	建议优化方案
抗体贮藏和操作不当	抗体应保存在2-8°C中。荧光结合抗体不应暴露在光线下，应避免冷冻。确认说明书上提示的贮藏和操作条件。
荧光染料淬灭	荧光抗体和荧光抗体染色后的样本都应该避光保存。
自发荧光较高	细胞的自发荧光取决于细胞的类型，也可能受到细胞制备方法的影响。自发荧光较高会遮盖阳性染色。改变抗体的荧光染料形式，避开与自发荧光相同发射光的染料。例如，由黄色、绿色、红色激光和红外线激光(650nm)激发的荧光染料。

无染色/弱染色	
染色方案	
可能原因	建议优化方案
抗体不是最佳浓度	通过抗体滴定, 找到该实验的最佳浓度。
染色时间和温度不正确	一些克隆在较高温度下和/或较长染色时间下的染色效果较好。有关孵育时间和温度的建议, 请参见产品说明书。
使用的二级抗体不正确	使用的二级抗体必须匹配一级抗体的物种(例如: 如果一级抗体来自于小鼠, 则使用抗小鼠二级抗体)。确保使用正确的二级抗体。
使用错误的缓冲液染色细胞内蛋白	为了获得最佳细胞内蛋白染色, 应该使用正确的缓冲液系统进行细胞固定并破膜, 以检测胞浆和细胞核蛋白。有关最佳缓冲液系统的信息, 请参见 <b>产品说明书</b> 。
洗涤不充分	洗涤不充分可导致背景值过高, 遮盖阳性结果。确保使用推荐的染色方案和洗涤方案。

无染色/弱染色	
抗原	
可能原因	建议优化方案
分泌性胞内蛋白	流式细胞检测时, 细胞因子、趋化因子和生长因子等分泌性蛋白必须保留在细胞内。使用莫能菌素、布雷菲尔德菌素A或者两者联合使用, 例如: Protein Transport inhibitor Ccktail (500X) (货号 00-4980)。
未知的蛋白表达	使用明确表达的样本作为阳性对照。
蛋白质下调、内化或从细胞中被剪切	确定使用的刺激条件不会影响蛋白质定位。改用细胞内染色可以改善已被内化的蛋白质的检测, 例如 CD152 (CTLA-4)。为防止蛋白质被剪切, 可以在染色前/后立即固定; 如果在染色前固定, 确保抗体能够识别固定后的表位。(参见第60页, “ <b>固定/破膜后抗体克隆的性能</b> ”一节。)
蛋白的表达水平过低	对于表达水平过低的抗原, 染色时使用最亮的荧光染料。两步法染色有时可以提高敏感性, 例如先使用生物素化抗体, 再使用荧光结合二级抗体染色。
细胞的分离方案或冷冻贮藏破坏抗原	从固态组织或细胞培养皿中收集细胞使用的酶会破坏细胞表面蛋白质。尝试用非酶的试剂制备细胞, 例如10 mM EDTA。检查制备细胞的试剂和细胞的贮藏/处理, 是否可能影响抗原。
染色前固定	抗体无法识别固定后的表位, 只能用于固定前染色细胞。能识别固定表位的抗体, 参见第60页, “ <b>固定/破膜后抗体克隆的性能</b> ”。
抗体与其他物种的交叉反应	只有物种之间抗体表位相同的情况下, 抗体才能辨识其他物种。参见链接的产品说明或物种交叉反应表( <a href="http://www.ebioscience.com/application/flow-cytometry.htm">http://www.ebioscience.com/application/flow-cytometry.htm</a> )。

无染色/弱染色	
流式细胞仪	
可能原因	建议优化方案
激光器性能异常	使用流式细胞仪设定&跟踪 (CS&T) 微球, 以检查激光的校准和功能。细胞仪可能需要专人进行维修。
使用的滤片不正确	检查所用荧光染料的激发波长与发射波长, 确保使用正确的激光和滤片收集数据。
数据过度补偿	利用单染色对照和荧光减一 (FMO) 对照为每次实验设定补偿。
细胞群的设门不正确	确保对细胞群的正确设门。其他指标共染色有助于判断分析的细胞群是否正确。使用活性染料并对单细胞群设门, 可大幅度减少假阳性。
数据分析不正确	为最佳显示稀有细胞或染色暗淡的细胞, 利用双参数图观察细胞。
染色前固定	抗体无法识别固定后表位, 只能于固定前染色细胞。关于能识别固定表位的抗体, 参见第60页, “ <b>固定/破膜后抗体克隆的性能</b> ” (第60页)。

高背景/非特异性染色	
一般情况	
<b>可能原因</b>	<b>建议优化方案</b>
自体荧光较高	细胞的自体荧光取决于细胞的类型,也可能受到细胞制备方法的影响。使用相同刺激条件,但不用任何试剂染色的样本作为细胞自体荧光的对照。
抗体与死细胞结合	染色中包含使用活性染料染色,来排除死细胞。FVD是最好的选择,特别是与细胞内蛋白染色联合使用。参见第89页“ <b>活性染料表</b> ”。
Cy5染料	Cy5和其他基于青蓝色素的染料,会与特定细胞的Fc受体非特异性结合,例如:单核细胞和巨噬细胞。如果涉及到此类非特异性结合的细胞,考虑使用其他荧光染料。
染色方案	
<b>可能原因</b>	<b>建议优化方案</b>
抗体浓度过高	滴定抗体的用量。建议进行两倍梯度稀释。推荐的起始浓度,参见产品说明书。
二级抗体/试剂非特异性结合	滴定二级抗体,使本底降至最低程度。阻断Fc受体。确保使用已经被高度认可无非特异性的二级抗体。
染色时间太长	根据实验细胞表达,优化抗体浓度和孵育时间。
洗涤不充分	增加染色后的洗涤次数。
Fc阻断不充分	使用Fc阻断试剂。例如,用于小鼠细胞的抗小鼠CD16/32(货号 14-0161),和用于人体外周血细胞的纯化的人Fc受体结合抑制剂(货号 14-9161)。如果使用二级抗体,确认它不会与Fc受体阻断剂结合。

高背景/非特异性染色	
流式细胞仪	
可能原因	建议优化方案
补偿调节不足	利用单染色对照和荧光减一 (FMO) 对照为每次实验设定补偿。

染色异常情况	
同型对照染色超过受检抗体	
可能原因	建议优化方案
使用的同型对照浓度不对	使用与检测抗体浓度相同的同型对照。
同型对照来自于不同厂家	使用与实验抗体同一厂家生产的同型对照。
FSC/SSC 散射特征异常	
可能原因	建议优化方案
固定/破膜液影响细胞特性	调整FSC/SSC电压, 使细胞处于可视范围之内。
刺激条件改变细胞特性	使用标志物反设门识别细胞。调整FSC/SSC电压, 使细胞处于可视范围之内。
假阳性染色	
可能原因	建议优化方案
分析中包含细胞黏连体或死细胞	单细胞群设门, 并使用活性染料, 排除黏连体和死细胞。

## 染色结果异常

## 补偿值异常升高

## 可能原因

## 建议优化方案

PMT设定电压设定不正确

根据样本优化电压设定。

## 无阳性细胞（稀有细胞分析）

## 可能原因

## 建议优化方案

细胞采集数量不够

如要检测非均匀细胞群里的罕见细胞, 为使统计学上有意义, 应遵照泊松统计采集一定数量的细胞。[Hedley B., et al., Technical issues: flow cytometry and rare event analysis. *International Journal of Laboratory Hematology* **35**(3):344-350 (2013)].

**上海**

上海市浦东新区新金桥路27号3,5,7号楼

邮编 201208

电话 021-58854588/2570

**生命科学产品和服务业务**

上海市长宁区仙霞路89号21-22楼

邮编 200061

电话 021-81452826 / 021-81453837

**成都**

成都市锦江西路1号锦江国际大厦1408室

邮编 610041

电话 028-68646388/6300

**南京**

南京市中央路201号南京国际广场南楼1103室

邮编 210000

电话 021-68854888/2801

**北京**

北京市安定门内大街28号雍和大厦西塔7层

邮编 100037

电话 010-84193888/3220

**生命科学产品和服务业务**

北京市朝阳门东三环北路2号海航大厦1711室

邮编 100027

电话 010-84481802

**沈阳**

沈阳市沈河区惠工街10号卓融大厦B109室

邮编 110013

电话 024-81098368/8801

**武汉**

武汉市东湖新技术开发区高新大道生物国际

生物国际C4楼4楼

邮编 430076

电话 027-88744888/5401

**广州**

广州国际生物电堂字三座28、38号合发国际广

东北路24-208单元

邮编 510000

电话 020-32401800

**西安**

西安市高新区科技路88号林荫国际大厦

1008-06单元

邮编 710076

电话 029-84800588/8801

**昆明**

云南南明区五华区三市街8号柏联广场写字楼208单元

邮编 650021

电话 0871-88118328/7001

赛默飞世尔科技。赛默飞世尔科技是纳斯达克上市公司

仅供研究使用，禁止用于临床诊断目的。



赛默飞  
生命科学 官方微店

赛默飞世尔科技在全国拥有21个办事处。本网站中的信息，仅供参考不能用于临床诊断，恕不另行通知。

**ThermoFisher**  
SCIENTIFIC