



流式胞内及核内蛋白染色方案

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

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 (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	细胞核和胞浆 (细胞因子和转录因子)	
	固定细胞		
	破膜		表面蛋白染色
	洗涤		固定+破膜
	蛋白染色		洗涤
			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)

方案 A: 胞浆蛋白的两步法方案

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。

实验步骤 :12X75mm 流式管中的实验操作

1. 制备单细胞悬液。详情参见“流式细胞制备方案”。
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”。
3. 进行细胞表面染色。详情参见“细胞表面蛋白染色, 方案 A”。
4. 最后一次洗涤后, 弃上清, 并脉冲式涡旋样本, 直到细胞团块完全分离。通常残留液量大约为 100ul。
5. 加入 100ul IC 固定液固定细胞, 然后脉冲式涡旋混匀。
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 100ul 1X 破膜剂重悬细胞。加入荧光直标抗体, 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。

方案 B: 胞内 (核内) 蛋白的一步法方案

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)
- [可选] 正常小鼠血清
- [可选] 正常大鼠血清
- 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。

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”。
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”。
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”。
4. 最后一次洗涤后, 弃上清, 并脉冲式涡旋样本, 直到细胞团块完全分离。通常残留液量大约为 100ul。
5. 每管加入 1mL 1X Foxp3 固定 / 破膜缓冲液并脉冲式涡旋。
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 100ul。
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。



赛默飞
官方微信



赛默飞
生命科学官方微信

免费服务电话: 800 820 8982/400 820 8982

信息咨询邮箱: LifeScience-CNTS@thermofisher.com

ThermoFisher
S C I E N T I F I C