

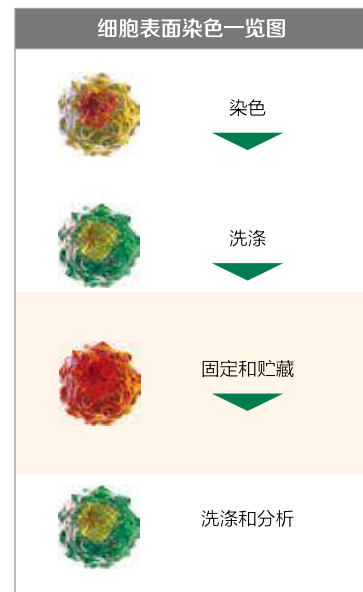
流式细胞表面蛋白染色方案

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 100uL 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
- 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”。
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 100ul 细胞标本加入 0.5-1g 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 100ul 细胞标本加入 20ul 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 50ul 细胞悬液 (10^5 - 10^8 细胞)。
4. 将每种抗体按照推荐用量混合于流式染色缓冲液中, 使染色液的终体积达到 100ul (例如, 50ul 细胞加入 50ul 抗体混合液), 脉冲式轻轻涡旋以混合均匀。

荧光直标抗体

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 200ul。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 200ul。室温 400-600xg 离心 5 分钟, 弃上清。
10. 重复第 9 步。
11. 使用 100ul 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 200ul。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”, 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 100ul 流式细胞染色缓冲液中重悬细胞, 加入 100ul 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

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
- 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)

实验步骤

注: 抗体结合与温度有关。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 100ul 全血。
 2. [可选] 每 100ul 全血加入 20ul 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°C 室温孵育 10-20 分钟。
 3. 将每种抗体按照推荐用量混合于流式染色缓冲液中, 使最终染料的体积为 50ul, 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 100ul 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°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”, 染色细胞以区分死活细胞。
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。



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
SCIENTIFIC