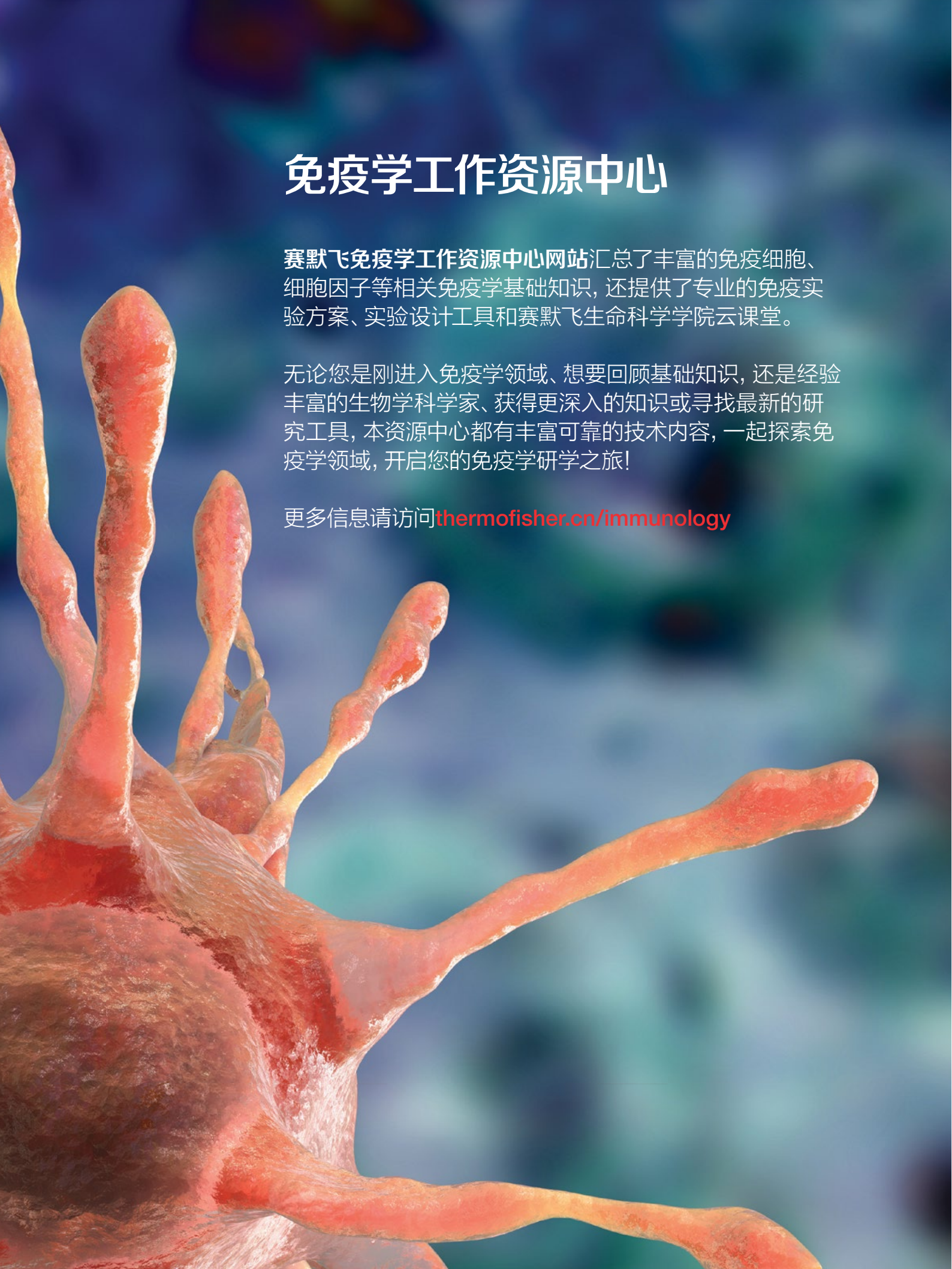


流式细胞术

流式细胞分析实验方案





免疫学工作资源中心

赛默飞免疫学工作资源中心网站汇总了丰富的免疫细胞、细胞因子等相关免疫学基础知识, 还提供了专业的免疫实验方案、实验设计工具和赛默飞生命科学学院云课堂。

无论您是刚进入免疫学领域、想要回顾基础知识, 还是经验丰富的生物学科学家、获得更深入的知识或寻找最新的研究工具, 本资源中心都有丰富可靠的技术内容, 一起探索免疫学领域, 开启您的免疫学研学之旅!

更多信息请访问thermofisher.cn/immunology

目录

流式样本制备	
从人全血中分离PBMC	1
从小鼠骨髓中分离细胞	2
小鼠脾细胞分离实验方案	5
流式细胞染色方案: 全血样本	7
红细胞裂解	11
免疫细胞刺激	
体外分化单核细胞为巨噬细胞	17
刺激免疫细胞产生细胞因子	21
T细胞活化	25
细胞表型分析	
流式细胞表面染色	27
流式胞内抗原染色	28
流式胞内细胞因子染色指南	44
补偿调节	47
流式配色方案设计	49
CellBlox™ 封闭缓冲液使用方案	54
细胞活性和凋亡	
细胞活性检测	59
Annexin V细胞凋亡检测	62
喜树碱诱导细胞凋亡	68
细胞周期	
活细胞中的DNA含量分析	69
固定细胞的DNA含量分析	73
细胞增殖	
细胞增殖检测	71
T细胞增殖功能检测	86

流式细胞术

流式样本制备



从人全血中分离外周血单个有核细胞 (PBMC)

介绍

所有流式细胞术检测的样本均需是单细胞悬液。外周血中的或悬浮生长的细胞十分方便制备成单细胞悬液，而贴壁细胞、实体组织或肿瘤组织需先制备成单细胞悬液，才能完成流式分析实验方案。目前制备单细胞悬液的方法有很多，其中常用到酶消化或机械性组织解离。当使用整合剂或酶消化处理样本时，应格外注意，因为此类解离过程可能会破坏细胞上的抗原表达。还有，在任何情况下都应该去除流式样本中的细胞团块、死细胞和碎片，使得最终排除假阳性以及获得最佳的结果。

材料

- Invitrogen eBioscience流式细胞染色缓冲液 (Flow Cytometry Staining Buffer, 货号00-4222-26)
- 磷酸盐缓冲液 (例如Gibco PBS [10X], pH 7.4, 货号70011044)
- 15 mL或50 mL离心管 (例如Nunc 15 mL无菌离心管, 货号339650)
- Ficoll-Paque™ PLUS或其它密度梯度分离液

实验步骤

1. 在离心管中，使用PBS以至少1:1的比例稀释血液样本。
2. 准备与稀释前全血样本相同体积的Ficoll，加入到离心管的底部 (或在Ficoll的上层缓缓加入稀释后的全血)。
3. 在室温下，以400 x g离心20分钟 (离心过程中务必使“Brake”按键处于关闭状态，或将离心机加减速调至最低)。
4. 采集PBS和Ficoll层交界处的PBMC到新试管内。
5. 在离心管中加入适量PBS，洗涤细胞。
6. 在2-8°C下，以300-400 x g离心细胞4-5分钟。弃掉上清液。
7. 用适量的流式细胞染色缓冲液 (Flow Cytometry Staining Buffer, 货号00-4222) 重悬细胞，然后进行细胞计数和活性检测。
8. 重复步骤6离心细胞，然后用流式细胞染色缓冲液 (Flow Cytometry Staining Buffer) 重悬细胞，使细胞最终浓度达到 1×10^7 个细胞/mL (细胞终浓度可随不同实验要求而不同)。

注

使用本实验方案进行细胞分离需使用实验方案中提到的各项产品，不建议更换不同产品。

注

若继续培养分离的细胞，所有步骤均需无菌操作，并使用不含叠氮化物的缓冲液。

从小鼠骨髓中分离细胞

介绍

本实验方案适用于分离骨髓中的细胞[1,2]。与全血相比，骨髓中包含的细胞类型更为复杂，包括造血干细胞（可分化成白细胞、红细胞和血小板等）以及基质细胞（如内皮细胞、成纤维细胞、巨噬细胞、成骨细胞、破骨细胞和脂肪细胞）。

材料

- 细胞培养皿（例如Thermo Scientific Nunc EasYDish 100 mm培养皿，货号150466）
- 实验室擦拭纸（例如Fisher Scientific Kimberly-Clark Professional Kimtech Science Kimwipes 1-PlyFisher专用擦拭纸，货号06-666）
- 乙醇（如分子生物学级别无水乙醇，200 Proof，货号T038181000CS）
- RPMI完全培养基
 - RPMI 1640培养基（如Gibco BenchStable RPMI 1640，货号A4192301）
 - 2 mM 左旋谷氨酰胺（如Gibco 200 mM L-Glutamine,, 货号25030149）
 - 胎牛血清（如Gibco Fetal Bovine Serum胎牛血清，货号26140087）
 - 可选：青霉素-链霉素（例如Gibco Gibco Penicillin-Streptomycin [5,000 U/mL]，货号15070063或Gibco Penicillin-Streptomycin [10,000 U/mL]，货号15140122）
- 手术刀和刀片
- 5-10 mL注射器
- 25号针头
- 70 μ m细胞筛
- 50 mL离心管（例如Thermo Scientific Nunc 50 mL无菌聚丙烯锥形离心管，货号339652）
- Invitrogen eBioscience 1X 红细胞裂解液（1X RBC Lysis Buffer，货号00-4333-57）或Invitrogen eBioscience 10X 红细胞裂解液 [多物种]（10X RBC Lysis Buffer (M μ Lti-species)，货号00-4300-54）
- Invitrogen Countess 3自动细胞计数仪（货号AMQAX2000）
- 磷酸盐缓冲盐水（PBS）（例如Gibco PBS [10X] pH 7.4，货号70011069）

实验步骤

细胞分离

1. 在无菌条件下, 分离小鼠的股骨骨髓, 并放入无菌细胞培养皿中。
2. 使用镊子和小剪刀剪掉肌肉组织和纤维组织。如果仍有肌肉组织附着于股骨上, 则用蘸有70%乙醇的Kimwipe擦拭纸擦拭股骨, 去除多余的肌肉纤维。
3. 往新的无菌细胞培养皿中加入5–7 mL RPMI完全培养基。RPMI 1640完全培养基制备方法: 添加胎牛血清 (最终浓度达10%) 和2 mM 左旋谷氨酰胺 (如果使用的不含GlutaMAX的培养基) 到RPMI 1640培养基中。RPMI 1640完全培养基制备方法: 向RPMI 1640培养基中添加胎牛血清, 使终浓度到10%; 且若不含GlutaMAX, 则添加2 mM左旋谷氨酰胺。
4. 用手术刀或锋利的剪刀切下股骨两端, 确保两端干净。
5. 将25号针头装在10 mL注射器上, 用注射器抽吸5 mL RPMI完全培养基。
6. 用镊子将骨头直立于细胞培养皿上方, 用注射器小心地将骨髓冲洗到细胞培养皿中。在必要时, 重复冲洗; 当骨头呈白色则表明已冲出所有骨髓。对所有骨头重复该步骤。
7. 将一个70 μ m细胞筛放置在一个新的50 mL离心管顶部 (离心管应竖直放置在管架上)。
8. 使用无菌血清移液器, 将所有骨髓从细胞培养皿中转移到细胞筛中。并用适量的RPMI完全培养基冲洗细胞培养皿, 继续将残留于培养皿中的骨髓转移到细胞筛中。
9. 使用10 mL注射器的柱塞 (请勿触摸柱塞的黑色橡胶, 保持无菌), 向下顺/逆时针碾碎70 μ m细胞筛中的骨髓。确认骨髓均被捣碎, 没有块状。
10. 用适量的RPMI完全培养基将柱塞端剩下的骨髓冲到筛网中, 尽可能多收集细胞。

技术提示

在冲洗股骨获得骨髓后, 还可使用研钵和研杵压碎股骨来获得更多细胞。骨髓也可以从压碎的骨盆骨和胫骨中分离获得。

可选

向培养基中添加1%青霉素-链霉素培养基 (5,000 单位/mL)。

从小鼠骨髓中分离细胞 (续)

11. 用5–7 mL RPMI完全培养基彻底冲洗筛网。之后取下筛网, 并将含有样本的离心管盖上盖子。
12. 在4°C下, 以600 x g离心细胞4分钟。弃掉上清液。
13. 向离心管中加入约5 mL RPMI完全培养基, 上下吹打以重悬细胞。
14. 将一个新的70 µm细胞筛放置在管架上一个新50 mL离心管的顶部。
15. 将重悬的骨髓样本重新过一次细胞筛并保存在离心管中。如需, 检测细胞活性。
16. 用适量的RPMI完全培养基重悬细胞样本, 最终达到所需的细胞浓度。

细胞计数

1. 使用红细胞裂解液裂解骨髓细胞样本中的红细胞, 方便进行免疫细胞计数。向100 µL样本中加入1 mL 1X 红细胞裂解液 (1X RBC Lysis Buffer, 货号00-4333-57)。
2. 在室温下孵育4–5分钟, 期间偶尔轻摇或旋转。
3. 加入2–3 mL 1X PBS, 终止裂解反应。
4. 在4°C下, 以600 x g离心细胞4分钟。弃掉上清液。
5. 向离心管中加入约500 µL RPMI完全培养基, 上下吹打以重悬细胞。
6. 使用Invitrogen Countess 3自动细胞计数仪或血球计数板对活细胞进行计数。

可选

使用Invitrogen MagniSort试剂盒对所需免疫细胞亚型进行磁珠分选, 或使用CD3功能性抗体、CD28功能性抗体或细胞刺激试剂盒 (Cell Stimulation cocktail, 货号00-4975-93) 对细胞进行刺激处理。

参考文献

1. J Biol Methods (2014) 1(1):e1.
2. Bio Protoc (2015) 5(20):e1631. PMID 27441207

介绍

脾脏是一个具有造血功能、红细胞清除和免疫功能的器官，因此脾脏十分适合获取免疫细胞。它能够清除掉病原体、异常细胞和细胞碎片，主要有红细胞和淋巴细胞，是多种免疫细胞亚型（包括粒细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞[DC]、NK细胞、T细胞和B细胞）的来源。淋巴细胞可直接通过脾细胞初步分离得到，而DC和巨噬细胞则需先对脾脏进行酶消化，再进行脾细胞初步分离得到。

材料

- Invitrogen eBioscience 10X 红细胞裂解液 [多物种] (10X RBC Lysis Buffer (M μ Lti-species), 货号00-4300-54)
- Gibco PBS[10X], pH 7.4 (货号70011044)
- 50 mL离心管 (例如Thermo Scientific Nunc 50 mL无菌聚丙烯锥形离心管, 货号339652)
- 细胞培养皿 (例如Thermo Scientific Nunc EasYDish 100 mm培养皿, 货号150466)
- 手术刀和刀片
- 一次性移液器
- 70 μ m细胞筛
- 5-10 mL注射器
- Hanks'平衡盐溶液

髓系细胞制备

- 胶原酶 (例如Gibco IV型胶原酶, 货号17104019)
- DNase (例如Thermo Scientific DNase I溶液, 货号90083)
- 胎牛血清 (例如Gibco胎牛血清, 货号26140087, 或单次规格胎牛血清, 货号A3160401)
- EDTA (例如MLtraPure 0.5M EDTA, pH 8.0, 货号15575020)

小鼠脾细胞分离实验方案(续)

实验步骤

1. 获取整个新鲜小鼠脾脏。
2. 将小鼠脾脏放入含5 mL HBSS缓冲液(Hanks' 平衡盐溶液)的培养皿中。
3. 使用刀片或手术刀,小心将脾脏切成小块($\sim 0.2\text{ cm}^2$)。若只进行简单的细胞分离,直接进行步骤5。
4. 髓系细胞制备如下:在 37°C 下,使用5 mL含IV型胶原酶(100 U/mL)和1% FBS的DNase (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的HBSS溶液消化小块状的脾脏,孵育20–30分钟。然后加入1 mM/mL EDTA,在室温下消化5分钟后,终止酶消化反应。
5. 将细胞筛放在50 mL离心管上方。
6. 使用一次性移液器,将消化后的脾组织转移到细胞筛上。
7. 使用注射器柱塞端,捣碎或碾碎脾脏,使其通过筛网。若有需,加入5–10 mL PBS冲洗。
8. 用适量的PBS冲洗细胞,使其通过筛网。如有必要,重复步骤5、6。
9. 在 4°C 下,以400–600 $\times g$ 离心细胞5分钟。弃掉上清液。
10. 用2–5 mL预冷的1X 红细胞裂解液(1X RBC Lysis Buffer, 货号 00-4333-57)重悬细胞。
11. 将细胞悬液置于冰上孵育5分钟。
12. 用10–20 mL冷的PBS洗涤细胞悬液。
13. 在 4°C 下,以400–600 $\times g$ 离心细胞5分钟。弃掉上清液。
14. 用适量PBS重悬细胞,使细胞终浓度达到 $2\text{--}3 \times 10^6$ 个细胞/mL。

重点注意事项

步骤1-8在室温下操作,步骤9-13在冰上操作。

介绍

这里的实验方案是通过流式检测全血样本中的细胞免疫表型，操作简单，这使得保留细胞结构功能和减少细胞损失[1,2]。全血中RBC与单个有核细胞比例约为600:1（取决于样本和物种）；若目的是观察到稀少细胞群，需要更多全血样本量[1,3-4]。在流式表面染色实验中，使用抗体标记全血样本中的细胞后可以上机分析；其中红细胞（RBC）可以在抗体染色后再裂解。在流式胞内染色实验中，全血样本裂解红细胞后，细胞破膜、抗体染色胞内标记物，随后即可流式分析。

材料

- 含有抗凝血剂（肝素、K3EDTA或K2EDTA）的采血管
- 12 × 75 mm 聚苯乙烯圆底试管（例如Thermo Scientific Samco 12 × 75 mm一次性培养管，货号12-007S）
- Invitrogen eBioscience流式细胞染色缓冲液（Flow Cytometry Staining Buffer，货号00-4222-26）
- 荧光标记一抗（例如经多重验证的Invitrogen流式抗体）
- 磷酸盐缓冲液（PBS）（例如Gibco PBS，pH 7.4，货号10010023）
- Invitrogen eBioscience 1X RBC裂解液（1X RBC Lysis Buffer，货号00-4333-57）或 Invitrogen eBioscience 10X 红细胞裂解液 [多物种]（10X RBC Lysis Buffer (M μ Lti-species)，货号00-4300-54）
- Invitrogen eBioscience破膜缓冲液[10X]（Permeabilization Buffer (10X)，货号00-8333-56）
- 可选：70 μ m细胞筛
- 可选：Invitrogen SYTOX细胞活性染色试剂盒[用于流式细胞分析]（SYTOX™ Dead Cell Stain Sampler Kit，货号S34862）
- 可选：Invitrogen eBioscience 一步法固定/裂解液[10X]（1-step Fix/Lyse Solution (10X)，货号00-5333-54）

流式细胞染色方案：全血样本（续）

实验步骤

全血样本处理

1. 使用肝素采样管采集全血，或使用含有10% EDTA二钾（1 μ L/100 μ L全血）的采样管。
2. 取100 μ L未裂解的全血样本加到12×75 mm试管中，分别作为抗体染色管和单色对照管（用于补偿调节）；剩余未裂解的全血样本可制备未染色空白对照管。

细胞表面染色

1. 准备抗体混合管：将流式抗体（靶标为细胞表面标记物的荧光标记抗体）加入到流式细胞染色缓冲液（Flow Cytometry Staining Buffer，货号00-4222-26）中。建议初次测试1:50 至1:100的抗体稀释比例。避光。
2. 将抗体混合物加到100 μ L全血中。
3. 在2-8°C下振荡孵育30分钟至1小时。避光。
4. 用2 mL流式细胞染色缓冲液（Flow Cytometry Staining Buffer）洗涤样本。可重复洗涤。
5. 在4°C下以500 x g离心5分钟。弃掉上清液，然后用500 μ L流式细胞染色缓冲液（Flow Cytometry Staining Buffer）重悬细胞。
可选：（若使用固定液或裂解液，请勿进行此步骤）在此步，加入SYTOX细胞活性染料（SYTOX™ Dead Cell Stain for flow cytometry，货号S34862），用于对活细胞设门。加入这类染料后，孵育后可直接上机检测，不需再洗涤样本。例如：向每500 μ L样本中加入0.5 μ L的SYTOX细胞活性染料（SYTOX™ Dead Cell Stain for flow cytometry），混匀。在室温下避光孵育20分钟。
6. **可选**如果直接上机分析样本，在室温下用70 μ M细胞筛过滤细胞，去除较大碎片。

技术提示

相比于裂解后全血或血清，未裂解全血样本应用的抗体浓度应该更高。

技术提示

查看网址[thermofisher.cn/nowashnolysewholeblood](https://www.thermofisher.cn/nowashnolysewholeblood)的应用文档，了解在Attune NxT流式细胞仪上免清洗、免裂解检测人全血样本中淋巴细胞的实验方案和设门策略。

可选: 红细胞裂解

1. 在室温下, 向100 μ L全血中加入2 mL的1X一步法固定/裂解液 (1-step Fix/Lyse Solution (10X), 货号00-5333-54), 然后轻轻上下颠倒混匀。裂解红细胞将使设门分析更加准确, 即使可能会影响免疫细胞功能。在这里, 一步法固定/裂解液 (1-step Fix/Lyse Solution) 同时实现裂解红细胞和固定细胞, 更重要的是稳定淋巴细胞群上的荧光抗体标记。
2. 在室温下避光孵育15-60分钟。
3. 样本可避光储存于2-8°C中, 时间不超过48小时。应在相同条件下储存用于补偿调节的单色对照样本和未染色空白对照样本。

流式细胞术分析

1. 上机分析样本。流式细胞仪配置的滤光片通道与所选的荧光染料吻合。
2. 为达到1-10%的CV值, 必须采集至少 10^5 - 10^7 个细胞数才有检测深度为0.1%的细胞群。采集速率应设置为慢速收集 (若使用Invitrogen Attune流式细胞仪, 则收集速率为200-500 μ L/min)。

技术提示

白细胞应为4,000-10,000个细胞/mL(3)。建议计算出若需具有统计学意义的结果所需的细胞数, 以估算实验所需的血液量(5)。

流式细胞染色方案: 全血样本 (续)

流式胞内染色

1. 在流式胞内抗体 (靶标为细胞内标记物的流式抗体) 标记前, 使用2 mL/ 100 μ L全血的1X一步法固定/裂解液 (1-step Fix/Lyse Solution (10X), 货号00-5333-54) 裂解红细胞并固定淋巴细胞。轻轻上下颠倒混匀, 在室温下避光孵育15-60分钟。
2. 将10X破膜缓冲液 (Permeabilization Buffer (10X), 货号00-8333-56) 稀释至1X: 将1份10X浓缩液与9份蒸馏水混合。
3. 在室温下, 以500 x g离心样本5分钟。弃掉上清液。
4. 用2 mL 1X破膜缓冲液 (Permeabilization Buffer (10X), 货号00-8333-56) 重悬细胞沉淀物, 在室温下以500 x g离心5分钟。弃掉上清液。重复一次。避光。
5. 用100 μ L流式细胞染色缓冲液 (Flow Cytometry Staining Buffer, 货号00-4222-26) 重悬细胞沉淀物。
6. 准备抗体混合管: 将流式胞内抗体 (靶标为细胞内标记物的流式抗体) 加到流式细胞染色缓冲液 (Flow Cytometry Staining Buffer) 中。避光。建议初次测试1:50至1:100的抗体稀释比例。
7. 向细胞悬液中加入抗体混合物。
8. 在室温下上下颠倒混匀, 孵育20-60分钟。避光。
9. 用2 mL流式细胞染色缓冲液 (Flow Cytometry Staining Buffer) 洗涤样本。可重复洗涤。
10. 在4°C下, 以500 x g离心5分钟后, 弃掉上清液。然后用500 μ L流式细胞染色缓冲液 (Flow Cytometry Staining Buffer) 重悬细胞。
11. 上样到流式细胞仪中, 分析样本。

参考文献

1. Methods (2018) 134–135: 149–163. PMID 29269150.
2. Oncotarget (2019) 10(65):6969–6980. PMID 31857851.
3. Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations (1990) 3rd edition. Boston: Butterworths; 1990. Chapter 153.
4. Clin Diagn Lab Immunol (2002) 9(3):708–712. PMID 11986282.
5. J Oncol (2010) 2010:426218. PMID 20049168.

介绍

在流式分析淋巴组织细胞悬液或外周血之前，通常红细胞（RBC）应当除去。尤其在流式分析人外周血中，应将红细胞裂解写在实验方案中。1X红细胞裂解液（1X RBC Lysis Buffer，货号00-4333）和10X 红细胞裂解液【多物种】（10X RBC Lysis Buffer (M μ Lti-species)，货号00-4300）适合用于裂解人外周血和小鼠组织（例如脾）细胞悬液中的红细胞，其中含有用于裂解红细胞的氯化铵，对白细胞的影响极小。10X一步法固定/裂解液（1-step Fix/Lyse Solution（10X），货号00-5333）允许在荧光抗体染色后同时进行红细胞裂解和淋巴细胞固定。Invitrogen eBioscience红细胞裂解液与所有荧光标记抗体相兼容。

红细胞裂解方案

- 方案A：使用1X或10X红细胞裂解缓冲液
 - A1. 在全血样本中抗体染色后裂解红细胞
 - A2. 在大体积人全血样本中裂解红细胞
 - A3. 在小鼠/大鼠脾脏或骨髓样本中裂解红细胞
- 方案B：使用一步法固定/裂解液

方案A：使用1X或10X 红细胞裂解缓冲液

Invitrogen eBioscience 红细胞裂解液的原理是由氯化铵产生的渗透压破碎无核红细胞，适用于全血样本（肝素或EDTA作为抗凝剂）或组织细胞悬液样本。10X红细胞裂解液（多物种）（10X RBC Lysis Buffer (M μ Lti-species)，货号00-4300）适用于外周血中红细胞的裂解，在人、小鼠、大鼠、犬和非人灵长类动物来源全血上得到验证；1X 红细胞裂解液（1X RBC Lysis Buffer，货号00-4333）适用于裂解人外周血或小鼠造血组织（如脾脏或骨髓）细胞悬液中的红细胞。

注

使用本实验方案进行红细胞裂解需使用实验方案中提到的各项产品，不建议更换为不同的产品。

一般注意事项

- 使用10X 红细胞裂解液（多物种）前，必须在常温下按1:10稀释。
- 实验表明，10X 红细胞裂解液（多物种）适用于含肝素或EDTA（抗凝剂）的血液样本。
- 若有少量残存的红细胞通常不会干扰后续细胞检测，可以在流式分析中通过设门排除。但必要时，可以做二次裂解。

红细胞裂解 (续)

材料

- 1X PBS
- 10X 红细胞裂解液 (多物种) (10X RBC Lysis Buffer (M μ Lti-species), 货号00-4300) 或1X 红细胞裂解液 (1X RBC Lysis Buffer, 货号00-4333)
- 50 mL离心管
- Invitrogen eBioscience流式细胞染色缓冲液 (Flow Cytometry Staining Buffer, 货号00-4222)
- 12 $\times$ 75 mm圆底试管
- 荧光标记一抗

注

若需裂解红细胞后抗体染色实验方案, 请参阅方案A2 (第13页)。

实验步骤

A1. 在全血样本中抗体染色后裂解红细胞

1. 向试管中加入全血样本。
2. 加入抗体 (总体积不得超过50 μ L), 充分混匀。请参考最佳染色方案thermofisher.cn/cellsurfacetargets中的流式细胞表面染色方案。
3. 在室温下避光孵育30分钟。
4. 加入2 mL 常温的1X 红细胞裂解液 (1X RBC Lysis Buffer, 货号00-4333), 然后涡旋或颠倒混匀。
5. 在室温下避光孵育。
6. 裂解后, 立即在室温下以500 $\times$ g离心5分钟。弃掉上清液。
7. 可选: 重复步骤4-6。
8. 用2 mL流式细胞染色缓冲液 (Flow Cytometry Staining Buffer, 货号00-4222) 重悬细胞, 然后按照步骤6离心。

技术提示

- 对于人, 使用100 μ L的血样。
- 对于小鼠, 使用50-100 μ L的血样。
- 对于大鼠, 使用50-100 μ L的血样。
- 对于犬, 使用100 μ L的血样。
- 对于非人灵长类动物, 使用100 μ L的血样。

技术提示

- 对于人, 孵育10-15分钟。
- 对于小鼠, 孵育4-10分钟。
- 对于大鼠, 孵育4-10分钟。
- 对于犬, 孵育10-15 分钟。
- 对于非人灵长类动物, 孵育10-15分钟。

注

通过观察样本的浑浊度评价红细胞裂解程度: 当样本从浑浊变得澄清时, 红细胞裂解完成。

注

通常不需步骤7, 因为少量残留红细胞不会干扰后续检测, 可以在流式分析中通过设门排除。

9. 弃掉上清液, 用适量的流式细胞染色缓冲液重悬细胞。

10. 上样到流式细胞仪中, 分析样本。

A2. 在大体积人全血样本中裂解红细胞

- 1. 向每1 mL的人全血中加入10 mL的1X 红细胞裂解液 (1X RBC Lysis Buffer, 货号00-4333)。
- 2. 在室温下孵育10-15分钟 (不得超过15分钟)。
- 3. 在室温下, 以500 x g离心5分钟。弃掉上清液。
- 4. 用适量的流式细胞染色缓冲液 (Flow Cytometry Staining Buffer, 货号00-4222) 重悬细胞。
- 5. 细胞计数和活性检测。
- 6. 如有需要, 继续进行细胞染色或培养。

注
如需继续培养细胞样本, 所有步骤需无菌操作。

注
通过观察样本的浑浊度评价红细胞裂解程度; 当样本从浑浊变得澄清时, 红细胞裂解完成。

红细胞裂解 (续)

A3. 在小鼠/大鼠脾脏或骨髓样本中裂解红细胞

1. 收集组织样本并制备成单细胞悬液。请参考最佳染色方案thermofisher.cn/cellpreparation中的流式细胞制备实验方案。
2. 在室温下, 以500 x g离心5分钟。弃掉上清液。
3. 用3-10 mL 1X 红细胞裂解液 (1X RBC Lysis Buffer, 货号00-4333) 重悬细胞。
4. 在室温下孵育4-5分钟。
5. 加入20-30 mL的1X PBS终止裂解反应。
6. 立即在室温下以500 x g离心5分钟。弃掉上清液。
7. 用2 mL流式细胞染色缓冲液 (Flow Cytometry Staining Buffer, 货号00-4222-26) 重悬细胞, 按照步骤6离心。弃掉上清液。
8. 用适量的流式细胞染色缓冲液重悬细胞。
9. 细胞计数和活性检测。
10. 如有需要, 继续进行细胞染色或培养。

注

建议对小鼠和大鼠组织使用1X 红细胞裂解液 (货号00-4333)。

注

如需继续培养细胞样本, 所有步骤需无菌操作。

方案B：使用一步法固定/裂解液1-step Fix/Lyse Solution

一步法固定/裂解液 (1-step Fix/Lyse Solution (10X), 货号00-5333) 可裂解红细胞并同时固定淋巴细胞。它适用于抗体染色后裂红和固定, 最终上样分析; 也适用于裂红和固定后再使用抗体染色, 但请注意确认所用抗体仍然能识别细胞固定后的抗原表位。还有, 机械性组织解离法通常可以将淋巴组织处理为单细胞悬液。

材料

- Invitrogen eBioscience流式细胞染色缓冲液 (Flow Cytometry Staining Buffer, 货号00-4222)
- 10X 一步法固定/裂解液 (1-step Fix/Lyse Solution (10X), 货号00-5333)
- 1X PBS
- 50 mL离心管
- 12 × 75 mm圆底试管
- 荧光标记一抗

实验步骤

1. 向100 μ L的全血中加入细胞表面染色的抗体, 充分混合。
2. 请参考最佳染色方案 thermofisher.cn/cellsurfacetargets 中的流式细胞表面染色方案。
3. 在室温下, 避光孵育30分钟。
4. 加入2 mL的常温1X 一步法固定/裂解液 (1-step Fix/Lyse Solution, 货号00-5333), 然后轻轻颠倒。
5. 在室温下, 避光孵育15-60分钟。
6. **可选:** 若在1X 一步法固定/裂解液中保存样本, 在2–8°C下最多3天 (避光: 对荧光亮度的影响降到最低)。

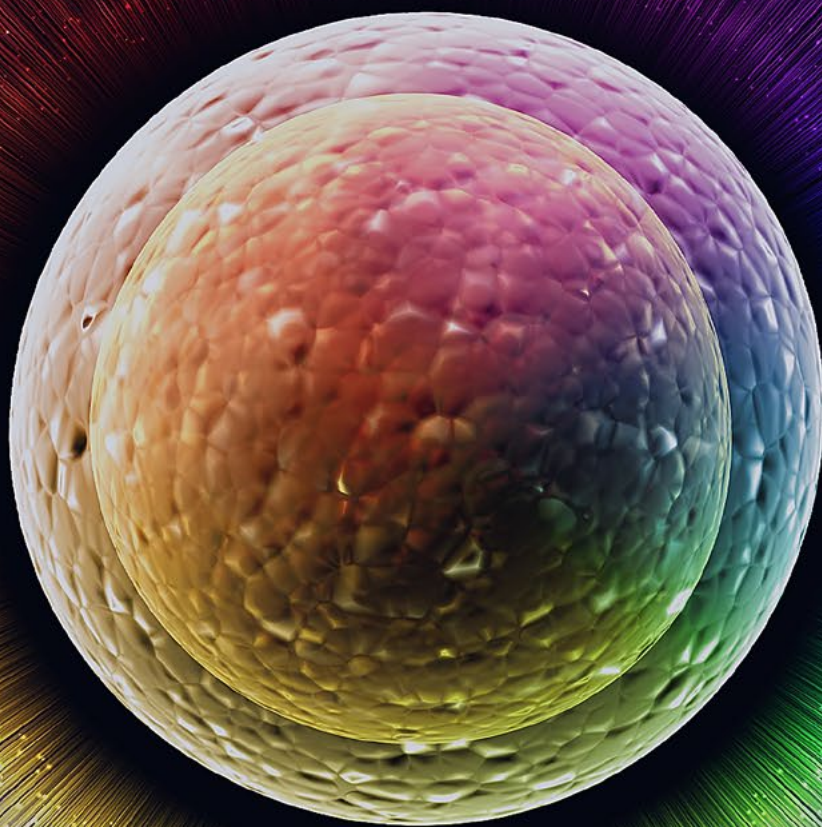
一般注意事项

- 使用10X 一步法固定/裂解液前, 必须在常温下按1:10稀释。
- 实验表明, 一步法固定/裂解液适用于含肝素或EDTA (抗凝剂) 的血液样本。



流式细胞术

免疫细胞刺激



介绍

从血液中分离细胞并将其在含血清的培养基中培养，贴壁的单核细胞就会分化为巨噬细胞。对于巨噬细胞培养，建议加入M-CSF等细胞因子；再加入IL-4、IL-10或TGF- β 等其他细胞因子，将有助于提高存活率。以下方案适用于T25或T75培养瓶，但也可将接种体积等比例缩小到100 mm培养皿或培养板。

材料

- 带透气盖的T25或T75无菌培养瓶（例如Nunc EasYFlask细胞培养瓶、T25、过滤盖，货号156367）
- RPMI 1640培养基（例如BenchStable RPMI 1640培养基，货号A4192301）
- 胎牛血清（例如Gibco胎牛血清，货号26140087，或单次规格胎牛血清，货号A3160401）
- 左旋谷氨酰胺（例如200 mM L-谷氨酰胺，货号25030149）
- 可选：青霉素-链霉素（例如Gibco青霉素-链霉素，货号15140148）
- M-CSF纯化蛋白（例如Gibco M-CSF人重组蛋白，货号PHC9504）
- 可选：IL-4纯化蛋白（例如IL-4人重组蛋白，货号A42602）
- 磷酸盐缓冲液（例如Gibco PBS [10X]，pH 7.4，货号70011044）
- EDTA（例如MLtraPure 0.5M EDTA，pH8.0，货号15575020）
- 50 mL离心管（例如Nunc 50 mL无菌锥形离心管，货号339652）
- Invitrogen eBioscience流式细胞染色缓冲液（Flow Cytometry Staining Buffer，货号00-4222-26）

技术提示

在Nunc UpCell Dishes上培养单核细胞能提高单核细胞活率和保留细胞表面蛋白。这种培养皿降低培养皿温度，无需消化酶即可收集到细胞，这保护了细胞膜及膜上受体。

单核细胞体外分化为巨噬细胞 (续)

实验步骤

1. 在无菌条件下, 从全血中分离PBMC (补充方案A, 第19页)。
2. RPMI 1640完全培养基的配制: 加入胎牛血清 (最终浓度达10%) 和2 mM左旋谷氨酰胺 (如果使用的是不含GlutaMAX 的培养基) 到RPMI 1640培养基中, 并使培养基的温度保持在37°C。
3. 重悬细胞于RPMI 1640完全培养基中, 使细胞浓度达 2×10^6 个细胞/mL。
4. 将细胞悬液转移到细胞培养皿中。
5. 在37°C、5% CO₂的培养箱中孵育24小时, 使单核细胞贴壁。
6. 在无菌离心管中, 制备含M-CSF人重组蛋白的RPMI 1640完全培养基, 最终浓度为40-50 ng/mL。
7. 用含M-CSF (和IL-4, 若添加) 的新培养基替换培养皿中的培养基。
8. 在37°C、5% CO₂的培养箱中孵育细胞6天。在这6天内, 每隔3-4天, 补充含40-50 ng/mL M-CSF人重组蛋白的新RPMI 1640完全培养基, 并用显微镜观察细胞状态和生长密度。
9. 当观察到细胞质中很多颗粒而且细胞形态略有增长时, 就可以收集细胞。此时, 细胞贴壁能力会更强。当收集细胞时, 弃掉旧培养基, 用1X PBS润洗培养皿中的细胞两次, 每次润洗后都弃掉PBS。
10. 向每个培养皿加入10 mL 10 mM EDTA, 在室温静置10分钟或等到细胞从培养皿底脱落。
11. 将细胞收集在50 mL离心管中, 在室温下以300-400 x g离心4-5分钟。
12. 弃掉上清液, 并用1X PBS重悬清洗细胞。
13. 以300-400 x g离心4-5分钟。

可选

添加1%青霉素-链霉素培养基 (5,000 units/mL)。

可选

加入20 ng/mL IL-4人重组蛋白。

可选

也可加入20 ng/mL的IL-4人重组蛋白。

单核细胞体外分化为巨噬细胞 (续)

14. 弃掉上清液, 用流式细胞染色缓冲液 (Flow Cytometry Staining Buffer, 货号00-4222-26) 或培养基重悬细胞。

补充方案A: 从全血中分离PBMC

材料

- 磷酸盐缓冲液 (例如Gibco PBS [10X], pH 7.4, 货号70011044)
- 15 mL或50 mL离心管 (例如Nunc 15 mL无菌离心管, 货号339650)
- Ficoll-Paque™密度梯度分离液
- Invitrogen eBioscience流式细胞染色缓冲液 (Flow Cytometry Staining Buffer, 货号00-4222-26)

步骤

1. 在离心管中, 使用PBS以至少1:1的比例稀释血液样本。
2. 在稀释的样本中, 加入与原始样本等体积的Ficoll-Paque™分离液。
3. 在室温下, 以400 x g离心20分钟 (离心过程中务必使 “Brake” 按键处于关闭状态, 或将离心机加减速调至最低)
4. PBMC处于PBS (含血浆) 层和Ficoll-Paque™分离液层之间的交界处, 采集PBMC到新试管中。
5. 在离心管中加入适量PBS, 洗涤细胞。
6. 在2-8°C, 以300-400 x g离心细胞4-5分钟。弃掉上清液。
7. 用适量的流式细胞染色缓冲液 (Flow cytometry staining buffer, 货号00-4222) 重悬细胞沉淀, 然后进行细胞计数和活性分析。
8. 重复步骤6离心细胞, 然后用适量的RPMI 1640完全培养基重悬细胞, 使细胞终浓度达到 2×10^6 个细胞/mL。

注

若继续培养细胞, 所有步骤均需采用无菌操作, 并使用不含叠氮化物的缓冲液。

技术提示

在评价刚采集的PBMC细胞健康和浓度时, 使用自动计数仪能够显著准确性。请查看thermofisher.cn/countess3.html, 了解如何使用Countess 3 FL自动细胞计数仪进行PBMC计数。

刺激免疫细胞产生细胞因子

介绍

佛波醇12-十四酸酯13-乙酸酯 (PMA)、离子霉素 (ionomycin)、布雷菲德菌素A (Brefeldin A) 和莫能菌素 (monensin) 这些刺激剂能够激活转录因子以及细胞内信号通路, 并促使多种不同免疫细胞产生细胞因子。Brefeldin A 是一种细胞内蛋白转运抑制剂, 能够使信号蛋白和细胞因子留在胞内。使用Brefeldin A 孵育正在培养的细胞, 会阻碍蛋白向高尔基复合体 (Golgi complex, GC) 转运, 使得蛋白在内质网 (Endoplasmic reticulum, ER) 中积聚。

当使用流式检测细胞内细胞因子时, 可以在细胞体外活化的终末时间内加入Brefeldin A。如果使用其他免疫学方法 (例如ELISA、蛋白免疫印迹或多重蛋白检测) 检测分泌蛋白, 则无需使用Brefeldin A处理。

材料

- 带透气盖的T25或T75无菌培养瓶 (例如Nunc EasYFlask细胞培养瓶、T25、过滤盖, 货号156367)
- RPMI 1640培养基 (例如BenchStable RPMI 1640培养基, 货号A4192301)
- 胎牛血清 (例如Gibco胎牛血清, 货号26140079)
- Invitrogen细胞刺激试剂盒 (含蛋白转运抑制剂) (Cell Stimulation Cocktail with protein transport inhibitors, PMA/ Brefeldin A/ ionomycin/ monensin, 货号00-4975-93) 或者Invitrogen细胞刺激试剂盒不含蛋白转运抑制剂 (Cell Stimulation Cocktail without protein transport inhibitors, PMA/ ionomycin, 货号00-4970-93)
- eBioscience布雷菲德菌素A溶液 (Brefeldin A solution, 货号00-4506-51)
- 细胞刮刀 (例如Nunc细胞刮刀, 货号179693)

刺激免疫细胞产生细胞因子 (续)

免疫细胞刺激

实验步骤

1. 在无菌条件下, 从全血中分离PBMC (补充方案A, 第22页) 或从淋巴组织中分离免疫细胞 (补充方案B, 第23页)。
2. 在制备RPMI 1640完全培养基时, 加入胎牛血清 (最终浓度达10%) 到RPMI 1640培养基中, 并使培养基的温度保持到37°C。
3. 用RPMI 1640完全培养基重悬细胞, 使细胞浓度达到 3×10^6 个细胞/mL。根据将使用的培养瓶规格 (T25或T75), 制备所需体积量。
4. 准备2个培养瓶: 一个标记“已刺激” (已活化), 另一个标记“未刺激” (未活化)。
5. 将细胞悬液 (在步骤3中制备) 均分至准备好的两个培养瓶中。
6. 向已刺激 (已活化) 培养瓶中加入浓度为 $1 \times 2 \mu\text{L/mL}$ 细胞刺激试剂盒 (Cell Stimulation Cocktail, 货号00-4975-93或00-4970-93)。
7. 向已刺激培养瓶和未刺激培养瓶中各加入浓度为 $1 \times 3 \mu\text{L/mL}$ 的布雷菲德菌素A溶液 (Brefeldin A solution, 货号00-4506-51)。
8. 用通气过滤盖盖住两个培养瓶, 并在37°C、5% CO_2 培养箱中孵育5小时。
9. 收集细胞。

技术提示

在流式细胞术实验中, 使用商品化固定缓冲液有助于改善细胞因子和转录因子流式实验以及最终结果。

补充方案A：从全血中分离PBMC

材料

- 磷酸盐缓冲液 (例如Gibco PBS [10X], pH 7.4, 货号70011044)
- 15 mL或50 mL离心管 (例如Nunc 15 mL无菌锥形离心管, 货号339650)
- Ficoll-Paque™ 密度梯度分离液
- Invitrogen eBioscience流式细胞染色缓冲液 (Flow cytometry staining buffer, 货号00-4222-26)

步骤

1. 在离心管中, 使用PBS以至少1:1的比例稀释血液样本。
2. 准备与稀释前全血样本相同体积的Ficoll, 加入到离心管的底部 (或在Ficoll的上层缓缓加入稀释后的全血)
3. 在室温下, 以400 x g离心20分钟 (离心过程中务必使 “Brake” 按键处于关闭状态, 或将离心机加减速调至最低)
4. PBMC处于PBS (含血浆) 层和Ficoll-Paque™分离液层之间的交界处, 采集PBMC到新试管中。
5. 在离心管中加入适量PBS, 洗涤细胞。
6. 在2-8°C下, 以300-400 x g离心4-5分钟。弃掉上清液。
7. 用适量的流式细胞染色缓冲液 (Flow cytometry staining buffer, 货号00-4222) 重悬细胞, 然后进行细胞计数和活性检测。
8. 重复步骤6离心细胞, 然后用适量的RPMI 1640完全培养基重悬细胞, 使细胞终浓度达到 3×10^6 个细胞/mL。

注

若继续培养细胞, 所有步骤均需无菌操作, 并使用不含叠氮化物的缓冲液。

技术提示

在评价刚采集的PBMC细胞健康和浓度时, 使用自动计数仪能够显著准确性。请查看[thermofisher.cn/ countess3.html](https://thermofisher.cn/countess3.html), 了解如何使用Countess 3 FL自动细胞计数仪进行PBMC计数。

补充方案B：从淋巴组织中分离免疫细胞

材料

- 60×15 mm细胞培养皿 (例如Nunc Cell C_ulture Petri Dishes, 货号150340)
- 3 mL塑料注射器或两个带毛玻璃的载玻片
- 细胞筛 (尼龙网)
- 15 mL或50 mL离心管 (例如Nunc 15 mL无菌锥形离心管, 货号339650)
- Invitrogen eBioscience流式细胞染色缓冲液 (Flow Cytometry Staining Buffer, 货号00-4222-26)

步骤

1. 将组织 (脾脏、胸腺或淋巴结) 收集至含有10 mL流式细胞染色缓冲液 (Flow Cytometry Staining Buffer, 货号00-4222-26) 的细胞培养皿中。使用3 mL注射器柱塞碾碎组织, 制备成单细胞悬液; 或者使用10 mL流式细胞染色缓冲液, 将组织置于两个载玻片的磨砂面之间研磨。
2. 将细胞筛放在15 mL离心管顶部。转移细胞培养皿中的细胞到细胞筛上并通过细胞筛过滤, 去除团块和碎渣。
3. 在2-8°C下, 以300-400 x g离心细胞悬液4-5分钟。弃掉上清液。
4. 用适量的流式细胞染色缓冲液 (Flow cytometry staining buffer, 货号00-4222-26) 重悬细胞, 然后进行细胞计数和活性检测。
5. 重复步骤3离心细胞, 然后用适量的RPMI 1640完全培养基重悬细胞, 使细胞终浓度达到3 × 10⁶个细胞/mL。

注

一般来说, 机械性破坏淋巴组织足以将细胞分解至单细胞悬液中。

注

若继续培养细胞, 所有步骤均需采用无菌操作, 并使用不含叠氮化物的缓冲液。

T细胞活化

介绍

T细胞体外扩增需要通过 $\alpha\beta$ -T细胞受体 (TCR复合物) 激活T细胞。使用功能级的单克隆抗CD3 抗体和抗 CD28 抗体刺激 T 细胞, 产生共刺激信号, 可与TCR共同促进抗原诱导的活化。下文所提供的T细胞活化实验方法 (包括添加生长因子或不添加生长因子的方法), 采用功能性抗体对T细胞进行活化, 是一种更加经济的T 细胞扩增方法。此外, 用于 T 细胞扩增和活化的 Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28 也可用于活化和扩增人 T 细胞。PMA 或伴刀豆球蛋白 A 能在短时间内促进细胞表达转录因子和细胞因子, 然后进行用于流式细胞术分析和免疫检测。

材料

- CD3功能性抗体 (例如Anti-Human CD3 Antibody, Functional Grade, OKT3, 货号16-0037-81, 或Anti-Mouse CD3e Monoclonal Antibody , 145-2C11, Functional Grade, 货号16-0031-85)
- CD28功能性抗体 (例如Ant-Human CD28 Antibody, Functional Grade, CD28.2, 货号16-0289-81, 或Anti-Mouse CD28 Antibody, Functional Grade, 37.51, 货号16-0281-82)
- RPMI 1640 培养基 (例如 BenchStable RPMI 1640 培养基, 货号: A4192301 或 OpTmizer T 细胞扩增, 货号: A3705001)
- 胎牛血清 (例如 Gibco 胎牛血清, 货号: 26140087, 或小包装胎牛血清, 货号: A3160401)
- 左旋谷氨酰胺 (例如 200 mM 左旋谷氨酰胺, 货号: 25030149)
- **可选:** 青霉素-链霉素 (例如 Gibco 青霉素-链霉素, 货号: 15140148)
- 经无菌细胞培养处理的 6 孔板 (例如 Nunc 经细胞培养处理的 6 孔板, 货号: 140675)
- 15 mL离心管 (例如 Nunc 15 mL无菌离心管, 货号: 339650)
- 磷酸盐缓冲液 (例如 Gibco PBS (10X), pH 7.4, 货号: 70011044)

人T细胞的活化

1. 准备6孔培养板, 前3孔标注“已活化T细胞”, 后3孔标注“未活化T细胞”。
2. 用无菌PBS稀释CD3功能性抗体(终浓度为1 $\mu\text{g/mL}$), 然后在标位“已活化T细胞”孔中包被CD3功能性抗体。即向前3个孔中加入稀释后的抗体(2 mL/孔)。将培养板放入37°C 5% CO₂ 培养箱中孵育2小时。
3. 将胎牛血清(终浓度达10%)和2 mM左旋谷氨酰胺添加到RPMI 1640培养基(如果使用GlutaMAX补充的培养基则无需添加), 即配制完成RPMI 1640完全培养基。使培养基的温度达到37°C。可选: 添加1%的青霉素-链霉素到培养基(5000单位/mL)。
4. 在无菌条件下, 从全血或淋巴组织中分离PBMC。
5. 用RPMI 1640完全培养基重悬细胞, 使其浓度达 3×10^6 个细胞/mL。
6. 将细胞悬液平均分到2个离心管中, 分别标注“已活化”和“未活化”。
7. 向“已活化”离心管中加入5 $\mu\text{g/mL}$ 的CD28功能性抗体, 然后放到培养箱中(室温)。
8. 2小时后, 从培养箱中取出6孔板。吸出CD3功能性抗体溶液并丢弃。不要润洗培养板。
9. 将标有“已活化”的细胞悬液(Step 7)平均分到6孔板上包被CD3功能性抗体的孔(“已活化T细胞”)中(每孔2-3 mL)。
10. 将标有“未活化”的细胞悬液平均转移到6孔板上未经CD3功能性抗体包被的孔(“未活化T细胞”)中(每孔2-3 mL)。
11. 将培养板放入5% CO₂培养箱中, 在37°C下培养1-3天。第1天, 细胞会产生转录因子和细胞因子。大多数T细胞最多三天就要进行T细胞的传代, 将每孔中T细胞一分为二。接种在新的孔中并补充培养基继续培养。这些细胞会形成团块, 但不会附着在培养板上。

技术提示

- 应根据实验测试情况优化CD3功能性抗体和CD28功能性抗体的最佳浓度范围。CD3功能性抗体(小鼠和人)的最佳浓度范围为1-3 $\mu\text{g/mL}$; CD28功能性抗体(小鼠和人)的最佳浓度范围为3-5 $\mu\text{g/mL}$ 。
- 为节省时间, 可在第3步中向培养基中直接加入CD3功能性抗体, 终浓度为1 $\mu\text{g/mL}$ 。
- 可选: 使用T75培养瓶进行培养, 更适用于培养更多的细胞数量以符合下游实验的需求。



流式细胞术

细胞表型分析



流式细胞表面染色

介绍

细胞表面标志物的典型作用是鉴定细胞群及细胞亚群，主要基于细胞谱系、发育阶段以及细胞功能；由此，荧光染料偶联的抗体标记到细胞表面标志物上，最终由流式细胞仪分析。这些表面标志物具有不同的结构和功能，包括可溶配体受体、细胞结合配体受体、离子通道、糖蛋白以及磷脂等。例如，CD4是辅助性T细胞的表面标志物，而细胞群会继续分化为更多细胞亚群，表达其他细胞表面标志物，如CD标志物和趋化因子受体。细胞群上独特的表达模式使目标细胞群分选出来，并用于后续实验。

流式细胞表面染色实验方案

- 方案A: 细胞悬液
- 方案B: 人裂红全血样本

实验方案A：细胞悬液

材料

- CD16/CD32抗体 (如Anti-Mouse CD16/32 Antibody, 93, 货号14-0161) 或人Fc受体结合封闭剂 (Human FC Receptor Binding Inhibitor, 货号14-9161)
- 流式细胞染色缓冲液 (Flow Cytometry Staining Buffer, 货号00-4222)
- 荧光直接标记一抗
- 如需, 荧光间接标记二抗
- 可选: 细胞活性检测染料及试剂:
 - 7-AAD细胞活性染色液 (7-AAD Viability Staining Solution, 货号00-6993)
 - 碘化丙啶染色液 (Propidium Iodide (PI) Staining Solution, 货号00-6990)
 - Invitrogen™可固定细胞活性染料 (Fixable Viability Dyes) eFluor™ 455 (紫外光, 货号65-0868)、eFluor™ 450 (货号65-0863)、eFluor™ 506 (货号65-0866)、eFluor™ 660 (货号65-0864) 和eFluor™ 780 (货号65-0865)
- 12 × 75 mm圆底试管或96孔板

注

使用本实验方案进行细胞染色需使用实验方案中提到的各项产品，不建议更换不同产品。

一般注意事项

- 为了妥善保存荧光标记抗体，请将抗体管2-8°C避光保存。请勿冷冻。
- 使用前，快速离心抗体管，回收管壁上的液滴。不建议涡旋抗体。
- 除非方案中注明，所有染色操作应在冰上或在2-8°C下进行并尽可能避光。
- 如果用荧光标记抗体染色后需要保存样本，将100 μL样本与100 μL 流式胞内固定缓冲液 (IC Fixation Buffer, 货号00-8222) 混合，或者加入2 mL一步法固定/裂解液 (1-step Fix/Lyse Solution (10X), 货号00-5333)。在这些缓冲液中，样本可在2-8°C下避光保存3天。
 - 注: 当使用上述缓冲液保存样本，Invitrogen™ APC-eFluor™ 780或PE-Cyanine7等偶联染料在染料亮度、荧光共振能量转移 (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET) 或者补偿调节影响很小。固定液品质会影响荧光染料亮度或FRET效率。流式胞内固定缓冲液 (IC Fixation Buffer) 能有效阻止串联染料信号的衰退，使得荧光染料在固定后仍然保持一致的性能，但待确定是否因克隆特异性有影响。
 - 注: 建议在固定样本之前，用可固定细胞活性染料 (FVD) 进行染色。

流式细胞表面染色(续)

实验步骤

1. 请参考最佳细胞制备方案, thermofisher.cn/cellpreparationflow。
2. **可选** 封闭Fc介导非特异性相互作用
小鼠细胞: 染色前, 将CD16/CD32抗体 (如Anti-Mouse CD16/CD32 Antibody, 93, 货号14-0161) 以0.5-1 μg /100 μL 样本在2-25°C下预孵育10-20分钟。
人类细胞: 染色前, 将人Fc受体结合封闭剂 (Human FC Receptor Binding Inhibitor, 货号14-9161) 以20 μL /100 μL 样本在2-25°C下预孵育10-20分钟。
3. 每个管或孔分别加入50 μL 细胞悬液 (10^5 - 10^8 个细胞)。
4. 将所有流式一抗按合适剂量加到流式细胞染色缓冲液 (Flow Cytometry Staining Buffer, 货号00-4222) 中, 并加到细胞悬液中, 使最终的染色体积为100 μL (例如50 μL 细胞样本+50 μL 抗体混合物)。轻轻地涡旋混匀。
5. 在2-8°C或冰上, 孵育30分钟以上。避光。
6. 将流式细胞染色缓冲液 (Flow Cytometry Staining Buffer) 以2 mL/管或200 μL /孔洗涤细胞。在室温下, 以400-600 x g离心5分钟。弃掉上清液。
7. 重复步骤6。
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 (Flow Cytometry Staining Buffer) 以2 mL/管或200 μL /孔洗涤细胞。在室温下, 以400-600 x g离心5分钟。丢弃上清液。
10. 重复步骤9。

注

抗体结合动力学和温度有关, 在冰上染色会需要更长的孵育时间。但部分抗体需要非标准孵育条件, 已在产品说明书中注明。

注

对于纯化一抗或生物素化一抗, 进行步骤8。

注

如果所有一抗均直接与荧光染料结合, 则进行步骤14。

11. 将所有荧光二抗按合适比例加到100 μL 流式细胞染色缓冲液 (Flow Cytometry Staining Buffer), 并加入细胞悬液中。在2-8°C或冰上, 孵育30分钟以上。避光。

12. 将流式细胞染色缓冲液 (Flow Cytometry Staining Buffer) 以2 mL/管或200 μL /孔洗涤细胞。在室温下, 以400-600 $\times$ g离心5分钟。弃掉上清液。

13. 重复步骤12。

14. **可选:** 请参考最佳细胞活性检测方案, thermofisher.cn/viabilitystaining。

15. **可选:** 分析前若需储存样本, 可将细胞重悬于100 μL 流式细胞染色缓冲液 (Flow Cytometry Staining Buffer) 中, 加入100 μL 流式胞内固定液 (IC Fixation Buffer, 货号00-8222) 或2 mL一步法固定/裂解液 (1-step Fix/Lyse Solution, 货号00-5333)。

16. 将细胞重悬于适当体积的流式细胞染色缓冲液 (Flow Cytometry Staining Buffer) 中。

17. 上样到流式细胞仪中, 分析样本。

流式细胞表面染色 (续)

方案B：人全血裂红样本

在用荧光标记抗体对全血样本进行染色后, 使用10X 红细胞 (RBC) 裂解液[多物种] (10X RBC Lysis Buffer (M μ Lti-species)) 或者一步法固定/裂解液 (10X) (1-step Fix/Lyse Solution (10X)) 裂解红细胞, 其中一步法固定/裂解液 (10X) 可一步完成裂解红细胞并固定白细胞。若在染色前使用该试剂, 请测试并确认您的流式抗体能识别固定细胞上的目标抗原, 可参考thermofisher.cn/antibodyfixation上的“固定破膜后的抗体克隆性能”表 (Antibody clone performance following fixation/permeabilization)。

材料

- Invitrogen eBioscience 10X 红细胞裂解液 [多物种] (10X RBC Lysis Buffer (M μ Lti-species), 货号00-4300-54), 或10X一步法固定/裂解液 (1-step Fix/Lyse Solution (10X), 货号00-5333)
- 荧光直接标记一抗
- 如需, 荧光间接标记二抗
- 人Fc受体结合封闭剂 (Human Fc Receptor Binding Inhibitor, 货号14-9161)
- 流式细胞染色缓冲液 (Flow Cytometry Staining Buffer, 货号00-4222)
- **可选:** 细胞活性检测染料及试剂:
 - 7-AAD细胞活性染色液 (7-AAD Viability Staining Solution, 货号00-6993)
 - 碘化丙啶染色液 (Propidium Iodide (PI) Staining Solution, 货号00-6990)
 - Invitrogen™可固定细胞活性染料 (Fixable Viability Dyes) eFluor™ 455 (紫外光, 货号65-0868)、eFluor™ 450 (货号65-0863)、eFluor™ 506 (货号65-0866)、eFluor™ 660 (货号65-0864) 和eFluor™ 780 (货号65-0865)

注

使用前, 10X RBC裂解液 (多物种) 和一步法固定/裂解液 (10X) 必须稀释到1X溶液: 以1倍体积试剂, 加入9倍体积、在室温的且试剂级的水。

实验步骤

1. 每个管中加入100 μ L全血样本。
2. **可选:** 将人Fc受体结合封闭剂 (Human Fc Receptor Binding Inhibitor, 货号14-9161) 以20 μ L/100 μ L 血液浓度来封闭Fc受体介导的非特异性相互作用。在2-8 °C或室温下, 孵育10-20分钟。

注

抗体结合动力学和温度有关, 在冰上染色会需要更长的孵育时间。但部分抗体需要非标准孵育条件, 已在抗体说明书中注明。

3. 将所有流式一抗按合适剂量加到流式细胞染色缓冲液(Flow Cytometry Staining Buffer, 货号00-4222)中, 使最终的染色体积为50 μ L。最终加入血液样本中。轻轻地涡旋混匀。

注

如果所有一抗均直接与荧光染料结合, 则进行步骤7。

4. 在室温下, 孵育20-30分钟。避光。

对于纯化抗体或生物素结合抗体

5. 加入2 mL流式细胞染色缓冲液 (Flow Cytometry Staining Buffer) 洗涤细胞。在室温下, 以400-600 x g离心5分钟。小心弃掉上清液。

6. 将所有荧光二抗按合适比例加到100 μ L流式细胞染色缓冲液 (Flow Cytometry Staining Buffer), 并加入全血样本中。在2-8°C或冰上, 孵育15-30分钟。避光。

注

如果使用10X RBC裂解液[多物种] (10X RBC Lysis Buffer (M μ Lti-species)), 孵育时间不能超过20分钟。

7. 在洗涤细胞之前, 加入2 mL新鲜制备的1X RBC裂解液并快速涡旋。在室温下, 孵育10-20分钟。避光。

8. 在室温下, 以400-600x g离心样本5分钟。弃掉上清液。

9. 加入2 mL流式细胞染色缓冲液 (Flow Cytometry Staining Buffer)。在室温下, 以400-600 x g离心5分钟。弃掉上清液。

10. 重复步骤9。

11. **可选:** 请参考最佳细胞活性检测方案, thermofisher.cn/viabilitystaining, 选择合适的细胞活性检测染料对样本进行染色。

注

碘化丙啶 (Propidium Iodide (PI)) 或 7-AAD等活性染料不适用于一步法固定/裂解液裂解过的细胞, 因为固定步骤会导致细胞破膜。在使用该试剂之前, 请使用可固定细胞活性染料 (FVD) 对全血进行染色; 请参考thermofisher.cn/viabilitystaining中的流式细胞活性检测方案。

12. 将细胞重悬于适当体积的流式细胞染色缓冲液 (Flow Cytometry Staining Buffer) 中。

13. 上样到流式细胞仪中, 分析样本。

流式胞内抗原染色

介绍

基于免疫荧光染色，流式细胞分析方法可在单细胞水平上同时检测细胞表面抗原和细胞内抗原。在流式胞内实验中，通常细胞可以用甲醛固定，然后用破膜剂或乙醇透化，使抗体可以进入细胞内，完成胞内染色。

在染色细胞内蛋白质时，它们在胞内的位置关系到合适的实验方案和固定破膜缓冲液。例如，细胞核内的蛋白和很多分泌蛋白可用Foxp3/转录因子固定破膜染色液套装（Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set, 货号00-5523），而检测细胞因子和趋化因子这些胞浆内分泌蛋白可选用细胞内固定破膜缓冲液套装（Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set, 货号88-8824）。最后，磷酸化信号通路蛋白检测更加适合与固定/甲醇实验方案。抗体表现在不同缓冲液中可能不同，需通过您的实验来确定合适的实验方案。

更多信息，请联系技术支持部门 Lifescience-cnts@thermofisher.com。

细胞内抗原染色方案

- **方案A：**两步法：细胞内（胞质）蛋白质
- **方案B：**一步法：细胞内（核内）蛋白质
- **方案C：**固定/甲醇两步法

方案A：两步法：细胞内（胞质）蛋白质

本实验方案可在单细胞水平上同时检测细胞表面抗原和细胞内的抗原。在流式胞内实验中，细胞固定之后需做破膜处理，即在细胞膜上穿孔，使荧光抗体进入胞浆进行染色。因此，固定破膜后的胞内染色均需在使用破膜液后进行。

本实验方案适用于检测在体外或体内活化后的细胞胞浆内蛋白、细胞因子或其他分泌蛋白。当检测细胞因子时，其刺激条件和分泌机制会因不同细胞类型及细胞因子特征而变化。例如，为了刺激T细胞产生IFN- γ 、TNF- α 、IL-2 和IL-4，可以使用PMA（佛波醇酯，蛋白激酶C激活剂）、离子霉素（钙离子载体）或CD3功能性抗体；为了诱导单核细胞产生IL-6、IL-10或TNF- α ，可以使用脂多糖（LPS）刺激。而且，在体外刺激实验中，需在刺激后的几小时内使用蛋白质转运抑制剂（例如莫能菌素（Monensin）或布雷菲德菌素A（Brefeldin A）溶液），阻断细胞因子的分泌；那么建议您首先评估在您的实验中不同蛋白质转运抑制剂的效果。

注

使用本实验方案进行细胞染色需使用实验方案中提到的各项产品，不建议更换不同产品。

注

- 为了保证荧光标记抗体的质量性能，请避光4°C保存，切勿冷冻。
- 使用前，快速离心抗体瓶，使抗体沉到管底，不建议涡旋抗体。
- 除非方案中注明，所有染色操作均应在冰上或在4°C下进行，并尽可能避光。
- 流式胞内实验中的固定和破膜步骤可能改变细胞的散射光特征，也可能增加非特异性背景染色。在染色液中加入蛋白大分子，如BSA或胎牛血清（FCS），可以降低这种非特异性结合。建议使用可固定细胞活性染料（FVD），有效去除死细胞。

检测转录因子这些核内蛋白时, 请查看方案B: 一步法: 细胞内(核内)蛋白质, 第36页。检测磷酸化通路信号分子, 如MAPK蛋白和STAT蛋白, 请查看方案C: 固定/甲醇两步法, 第40页。

材料

- 细胞刺激混合物(加蛋白质转运抑制剂)(500X)(Cell Stimulation Cocktail (plus protein transport inhibitors), 500X, 货号00-4975) 或
 - 蛋白质转运抑制剂混合试剂(500X)(Protein Transport Inhibitor Cocktail, 货号00-4980) 或
 - 布雷菲德菌素A溶液(Brefeldin A Solution, 货号00-4506) 或
 - 莫能菌素溶液(Monensin Solution, 货号00-4505)
- 细胞内固定破膜缓冲液套装(Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set, 货号88-8824)
- 流式细胞染色缓冲液(Flow Cytometry Staining Buffer, 货号00-4222)
- 荧光标记抗体
- 可选: Invitrogen™可固定细胞活性染料(Fixable Viability Dyes) eFluor™ 455(紫外光, 货号65-0868)、eFluor™ 450(货号65-0863)、eFluor™ 506(货号65-0866)、eFluor™ 660(货号65-0864), 或eFluor™ 780(货号65-0865)
- 12 × 75 mm圆底流式试管

流式缓冲液制备

- 使用前, 10X 破膜缓冲液(Permeabilization Buffer)必须稀释到1X破膜液。每份样本需8.5 mL 1X破膜缓冲液。

流式胞内抗原染色 (续)

使用12 × 75 mm流式管的实验方案

1. 制备单细胞悬液, 请参考最佳细胞制备方案thermofisher.cn/cellpreparation。
2. **可选:** 使用可固定细胞活性染料 (Fixable Viability Dyes), 请参考最佳细胞活性检测实验方案 (方案C), thermofisher.cn/viabilitystaining。
3. 细胞表面抗原染色, 请参考最佳细胞表面抗原染色方案 (方案A), thermofisher.cn/surfacetargetsflow。
4. 最后一次洗涤后, 弃掉上清液, 充分涡旋混匀样本, 通常保留100 μ L左右体积。
5. 加入100 μ L流式胞内固定液 (使用细胞内固定破膜缓冲液套装, Intracellular Fixation Buffer) 来固定细胞, 充分涡旋混匀样本。
6. 在室温下, 孵育20-60分钟。避光。
7. 加入2 mL 1X流式破膜缓冲液 (使用细胞内固定破膜缓冲液套装, Permeabilization Buffer), 在室温下, 以400-600 $\times$ g离心5分钟, 弃掉上清液。
8. 重复步骤7。
9. 加100 μ L 1X流式破膜液 (使用细胞内固定破膜缓冲液套装, Permeabilization Buffer) 重悬细胞, 并加入流式胞内抗体, 室温孵育20-60分钟。避光。
10. 加入2 mL 1X破膜液, 在室温下, 以400-600 $\times$ g离心5分钟, 弃掉上清液。
11. 重复步骤10。
12. 以适当体积的流式细胞染色缓冲液 (Flow Cytometry Staining Buffer, 货号00-4222) 重悬细胞。
13. 上样到流式细胞仪中, 分析样本。

使用96孔板的实验方案

1. 制备单细胞悬液, 请参考最佳细胞制备方案thermofisher.cn/cellpreparation。

2. 可选: 使用可固定的细胞活性染料 (Fixable Viability Dyes), 请参考最佳细胞活性检测实验方案 (方案C), thermofisher.cn/viabilitystaining。

3. 细胞表面抗原染色, 请参考最佳细胞表面抗原染色方案 (方案A), thermofisher.cn/surfacetargetsflow。

4. 最后一次洗涤后, 弃掉上清液, 充分涡旋混匀样本, 通常保留100 μ L左右体积。

5. 每孔加入200 μ L胞内固定缓冲液 (使用细胞内固定破膜缓冲液套装, Intracellular Fixation Buffer) 来固定细胞, 充分吹打混匀样本。

6. 在室温下, 孵育20-60分钟。避光。

7. 在室温下, 以400-600 x g 离心5分钟。弃掉上清液。

8. 每孔加入200 μ L 1X流式破膜缓冲液 (使用细胞内固定破膜缓冲液套装, Permeabilization Buffer), 在室温下, 以400-600 x g 离心5分钟, 弃掉上清液。

9. 用1X流式破膜缓冲液 (使用细胞内固定破膜缓冲液套装, Permeabilization Buffer) 重悬细胞, 将最终体积调至约100 μ L。

10. 可选: 用2% 正常小鼠/大鼠血清进行封闭 (加入2 μ L正常小鼠/大鼠血清到100 μ L细胞悬液中), 室温孵育15分钟。

11. 不需洗涤, 加入流式胞内抗体, 室温孵育30分钟以上。避光

12. 每孔加入200 μ L 1X流式破膜缓冲液 (使用细胞内固定破膜缓冲液套装, Permeabilization Buffer), 在室温下以400-600 x g离心5分钟。弃掉上清液。

13. 重复步骤12。

流式胞内抗原染色 (续)

14. 以适当体积的流式细胞染色缓冲液 (Flow Cytometry Staining Buffer, 货号00-4222) 重悬细胞。

15. 上样到流式细胞仪中, 分析样本。

方案B：一步法：细胞内（核内）蛋白质

本实验方案适用于在单细胞水平上同时检测细胞核内抗原、细胞胞浆抗原以及细胞表面抗原。使用Foxp3/转录因子固定破膜染色液套装 (Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set, 货号00-5523) 允许一步完成固定和破膜, 不仅检测T-bet、GATA3、ROR γ t及Foxp3等转录因子这些核内抗原, 还可同时检测很多胞浆细胞因子。若需确定Foxp3/转录因子固定破膜染色液套装是否适合您的细胞因子靶标, 以及抗体的克隆是否兼容Foxp3/转录因子固定破膜染色液套装, 请参考thermofisher.cn/antibodyfixation。

材料

- Foxp3/转录因子固定破膜染色液套装 (Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set, 货号00-5523)
- 流式细胞染色缓冲液 (Flow Cytometry Staining Buffer, 货号00-4222)
- 荧光标记抗体
- 可选: Invitrogen™可固定细胞活性染料 (Fixable Viability Dyes) eFluor™ 455 (紫外光, 货号65-0868)、eFluor™ 450 (货号65-0863)、eFluor™ 506 (货号65-0866)、eFluor™ 660 (货号65-0864), 或eFluor™ 780 (货号65-0865)
- 可选: 正常小鼠血清和正常大鼠血清
- 12 × 75 mm圆底流式管或96孔微孔板

流式缓冲液制备

- 使用前, 将1份Foxp3固定/破膜浓缩液 (Fixation/Permeabilization Concentrate, 货号00-5523) 与3份Foxp3固定/破膜稀释剂 (Fixation/Permeabilization Diluent, 货号00-5523) 混合, 制备成新鲜的Foxp3固定/破膜工作液 (Fixation/Permeabilization Working Solution)。如果在试管中染色, 每个样本需要1 mL工作液。

- 使用前, 将1份10X破膜液 (Permeabilization Buffer) 稀释到1X破膜缓冲液。如果在管中染色, 每份样本需要8.5 mL 1X破膜缓冲液。

使用12 x 75 mm流式管的实验步骤

1. 制备单细胞悬液, 请参考最佳细胞制备方案 thermofisher.cn/cellpreparation。
2. 可选: 使用可固定的细胞活性染料 (Fixable Viability Dyes), 请参考最佳细胞活性检测实验方案 (方案C), thermofisher.cn/viabilitystaining。
3. 细胞表面抗原染色。请参考最佳细胞表面抗原染色方案 (方案A), thermofisher.cn/surfacetargetsflow。
4. 最后一次洗涤后, 弃掉上清液并涡旋样本以完全解离细胞沉淀。通常保留约100 μ L 残余体积。
5. 加入1 mL Fc γ 3固定/破膜工作液 (使用Fc γ 3/转录因子固定破膜染色液套装, Fixation/Permeabilization Working Solution) 涡旋混匀。
6. 在2-8°C或室温下, 孵育30-60分钟 (小鼠细胞样本可在2-8°C下避光孵育最多18小时)。避光。
7. 加入2 mL 1X破膜缓冲液 (使用Fc γ 3/转录因子固定破膜染色液套装, Permeabilization Buffer), 在室温下以400-600 x g 离心5分钟, 弃掉上清液。
8. 可选: 重复步骤7。
9. 用1X破膜缓冲液 (使用Fc γ 3/转录因子固定破膜染色液套装, Permeabilization Buffer)重悬细胞, 将最终体积调至约100 μ L。
10. 可选: 用2%正常小鼠/大鼠血清进行封闭 (加入2 μ L正常小鼠/大鼠血清到100 μ L细胞悬液中), 室温孵育15分钟。
11. 不需洗涤, 加入流式胞内抗体, 室温孵育30分钟以上。避光。

流式胞内抗原染色 (续)

12. 加入2 mL (使用Foxp3/转录因子固定破膜染色液套装, Permeabilization Buffer), 在室温下以400-600 x g离心5分钟。弃掉上清液。

13. 重复步骤12。

14. 以适当体积的流式细胞染色缓冲液 (Flow Cytometry Staining Buffer) 重悬细胞。

15. 上样到流式细胞仪中, 分析样本。

使用96孔板的实验步骤

1. 制备单细胞悬液, 请参考最佳细胞制备方案 thermofisher.cn/cellpreparation。

2. **可选:** 使用可固定的细胞活性染料 (Fixable Viability Dyes), 请参考最佳细胞活性检测实验方案 (方案C), thermofisher.cn/viabilitystaining。

3. 细胞表面抗原染色。请参考最佳细胞活性检测实验方案 (方案A), thermofisher.cn/surfacetargetsflow。

4. 最后一次洗涤后, 弃掉上清液并涡旋样本以完全解离细胞沉淀。

5. 每孔加入200 μ L Foxp3固定/破膜工作液 (使用Foxp3/转录因子固定破膜染色液套装, Fixation/Permeabilization Working Solution), 充分吹打混匀样本。

6. 在2-8°C或室温下孵育30-60分钟 (小鼠细胞样本可在2-8°C下避光孵育最多18小时)。避光。

7. 在室温下, 以400-600 x g离心5分钟, 弃掉上清液。

注

若需, 可以同时进行细胞表面染色和细胞内磷酸蛋白染色。因细胞固定后抗体克隆不一定识别表面表型, 请参考 thermofisher.cn/antibodyfixation 上的“固定破膜后的抗体克隆性能”表 (Antibody clone performance following fixation/permeabilization)。

8. 每孔加入200 μ L 1X破膜缓冲液 (使用Foxp3/转录因子固定破膜染色液套装, Permeabilization Buffer), 在室温下以400-600 x g 离心5分钟, 弃掉上清液。

9. 重复步骤8。

10. 用1X破膜缓冲液 (使用Foxp3/转录因子固定破膜染色液套装, Permeabilization Buffer) 重悬细胞, 将最终体积调至约100 μ L。

11. **可选:** 用2%正常小鼠/大鼠血清进行封闭 (加入2 μ L正常小鼠/大鼠血清到100 μ L细胞悬液中), 室温孵育15分钟。

12. 不需洗涤, 加入流式胞内抗体, 室温孵育30分钟以上。避光。

13. 每孔加入200 μ L 1X破膜缓冲液(使用Foxp3/转录因子固定破膜染色液套装, Permeabilization Buffer), 在室温下以400-600 x g 离心5分钟。弃掉上清液。

14. 重复步骤13。

15. 以适当体积的流式细胞染色缓冲液 (Flow Cytometry Staining Buffer) 重悬细胞。

16. 上样到流式细胞仪中, 分析样本。

流式胞内抗原染色 (续)

方案C：固定/甲醇两步法

本实验方案适用于同时分析细胞内磷酸化信号蛋白和细胞表面蛋白；使用流式胞内固定液（Intracellular Fixation Buffer，货号00-8222）做细胞固定，使用甲醇处理做细胞破膜透化。在磷酸化蛋白检测实验中，不同细胞类型和特殊蛋白要求会影响到细胞刺激条件和蛋白磷酸化时间。例如，为了诱导STAT1蛋白（Y701）的磷酸化，可以用IFN- γ 激活巨噬细胞，而在T细胞中诱导ERK1/2蛋白（T202/Y204）的磷酸化，则需与PMA或CD3功能性抗体联合使用。

方案C的一般注意事项

- 荧光染料标记抗体可以染色细胞表面蛋白，也可染色细胞内磷酸化蛋白，但请注意：
 - 使用抗体染色活细胞表面抗原可能同时改变信号蛋白的表达，从而导致刺激/抑制信号传导。因此，不建议在细胞刺激之前进行细胞表面染色，可以一步同时进行细胞表面染色和细胞内染色。但请注意，部分蛋白在细胞膜上表达，也在细胞内表达；建议选择既能识别细胞膜抗原表位也能识别细胞固定后抗原表位的克隆抗体。请参考相关注意事项 thermofisher.cn/antibodyfixation。
 - 若在细胞固定前进行细胞表面染色，请考虑到细胞固定可能会破坏细胞表面抗原表位；因此，确定荧光染料标记耐受甲醇处理，才可在固定/甲醇处理步骤之前做表面染色。（甲醇耐受/敏感荧光染料参见下表）

甲醇耐受荧光染料	甲醇敏感荧光染料
Alexa Fluor 488	PE
eFluor660	PE串联染料
Alexa Fluor 647	PerCP
eFluor 450	PerCP串联染料
FITC	APC
	APC串联染料

- 对于贴壁细胞，我们建议将细胞固定在板/微孔中。固定后，刮下细胞或用EDTA溶液处理，以便收集细胞以备后续操作。如果不需要表面染色或表面蛋白对胰蛋白酶消化不敏感，可以使用胰蛋白酶消化细胞。

材料

- 流式胞内固定缓冲液 (Intracellular Fixation Buffer, 货号00-8222)
- 90-100%甲醇 (HPLC级)
- 细胞刺激剂
- 一抗 (荧光染料直接标记)
- 流式细胞染色缓冲液 (Flow Cytometry Staining Buffer, 货号00-4222)
- **可选:** Fc封闭: CD16/CD32抗体 (如Anti-Mouse CD16/32 Antibody, 93, 货号14-0161) 或人Fc受体结合封闭剂 (Human FC Receptor Binding Inhibitor, 货号14-9161)
- 12 × 75 mm圆底流式管或96孔U型或V型底微孔板
- 自选组织培养基

使用12 x 75 mm流式管的实验步骤

1. 选择合适的培养基, 准备用于刺激的细胞。
2. 细胞计数, 用合适体积的培养基重悬细胞, 调整细胞浓度为 $1-5 \times 10^6$ 细胞/mL。
3. 根据设置的时间点, 在37°C对细胞进行适当的刺激。建议同时孵育未刺激的细胞, 作为阴性对照。
4. 可选: 如在固定前需做表面染色 (在步骤5中), 请参考最佳细胞表面靶标染色实验方案, thermofisher.cn/surfacetargetsflow, 使用甲醇耐受的荧光染料标记抗体进行染色。
5. 细胞刺激处理结束后, 直接加入等体积的胞内固定缓冲液 (IC Fixation Buffer) 固定细胞并终止细胞刺激。
6. 在室温下, 孵育10-60分钟。避光。
7. 在室温下, 以400-600 × g离心5分钟, 弃掉上清液。
8. 重悬离心得到的细胞团, 加入1 mL预冷的90-100%甲醇, 涡旋混匀, 2-8°C孵育至少30分钟。

注

加入甲醇后, 细胞可以在 $<-20^{\circ}\text{C}$ 条件下存放4周。

流式胞内抗原染色 (续)

9. 用大体积的流式细胞染色缓冲液 (Flow Cytometry Staining Buffer) 洗涤细胞。
10. 在室温下, 以400-600 x g 离心5分钟, 弃掉上清液。
11. 用流式细胞染色缓冲液 (Flow Cytometry Staining Buffer) 重悬细胞, 调整细胞浓度为 1×10^7 细胞/mL, 并向每个流式管中加入 1×10^6 个细胞 (100 μ L)。
12. 可选: 在染色前, 可使用CD16/CD32抗体 (如Anti-Mouse CD16/32 Antibody, 93, 货号14-0161) 或人Fc受体结合封闭剂 (Human FC Receptor Binding Inhibitor, 货号14-9161) 进行封闭, 阻断Fc受体的非特异性结合。
13. 每管加入推荐量的荧光抗体, 在室温下孵育30-60分钟。避光。
14. 加入2 mL流式细胞染色缓冲液 (Flow Cytometry Staining Buffer), 在室温下400-600 x g 离心5分钟。弃掉上清液。
15. 重复步骤14。
16. 用适当体积的流式细胞染色缓冲液 (Flow Cytometry Staining Buffer) 重悬细胞。
17. 上样到流式细胞仪中, 分析样本。

注

若需, 可以同时进行细胞表面染色和细胞内磷酸蛋白染色。因细胞固定后抗体克隆不一定识别表面表型, 请参考 thermofisher.cn/antibodyfixation 上的“固定破膜后的抗体克隆性能”表 (Antibody clone performance following fixation/permeabilization)。

使用96孔板的实验步骤

1. 在合适的培养基中培养细胞, 并对细胞进行刺激
2. 细胞计数, 用合适体积的培养基重悬细胞, 调整细胞浓度为 $1-5 \times 10^6$ 细胞/mL。
3. 每孔加入100 μ L含有适当刺激剂的培养基。
4. 每孔加入100 μ L细胞, 37°C孵育到合适的时间。建议同时孵育未刺激的细胞, 作为阴性对照。

5. **可选:** 如在固定前需做表面染色 (在步骤6中), 请参考最佳细胞表面靶标染色实验方案”, thermofisher.cn/surfacetargetsflow, 使用甲醇耐受的荧光染料标记抗体进行染色。
6. 细胞刺激处理结束后, 加入200μL胞内固定缓冲液 (Intracellular Fixation Buffer) 固定细胞并终止细胞刺激。
7. 在室温下, 孵育10-60分钟。避光。
8. 在室温下, 以400-600 x g 离心5分钟。弃掉上清液。
9. 重悬剩余细胞, 加入100 μL预冷的90-100%甲醇, 涡旋混匀, 2-8°C孵育至少30分钟。
10. 加入200 μL流式细胞染色缓冲液 (Flow Cytometry Staining Buffer), 在室温下400-600 x g 离心5分钟。弃掉上清液。
11. 重复步骤10。
12. **可选:** 在染色前, 可使用CD16/CD32抗体 (如Anti-Mouse CD16/32 Antibody, 93, 货号14-0161) 或人Fc受体结合封闭剂 (Human FC Receptor Binding Inhibitor, 货号14-9161) 进行封闭, 阻断Fc受体的非特异性结合。
13. 每管加入推荐量的荧光抗体, 在室温下孵育30-60分钟。避光。
14. 加入200 μL流式细胞染色缓冲液 (Flow Cytometry Staining Buffer), 在室温下400-600 x g 离心5分钟。弃掉上清液。
15. 重复步骤14。
16. 用适当体积的流式细胞染色缓冲液 (Flow Cytometry Staining Buffer) 重悬细胞。
17. 上样到流式细胞仪中, 分析样本。

注

加入甲醇后, 细胞可以在<-20°C下储存长达4周。

注

若需, 可以同时进行细胞表面染色和细胞内磷酸蛋白染色。因细胞固定后抗体克隆不一定识别表面表型, 请参考 thermofisher.cn/antibodyfixation 上的“固定破膜后的抗体克隆性能”表 (Antibody clone performance following fixation/permeabilization)。

流式胞内细胞因子染色指南

- 下表为小鼠和人细胞因子以及其他胞内蛋白的细胞内染色快速指南。
- 请查阅流式胞内染色实验方案。

小鼠细胞因子: 流式细胞内染色快速指南

细胞因子	细胞来源	活化条件	孵育时间	再刺激条件	蛋白转运抑制	抗体克隆
GM-CSF	小鼠脾脏	ConA(3 µg/mL)(2d)/IL-2(20 ng/mL)+IL-4(20 ng/mL)(3d)	2d/3d	CD3功能性抗体(10 µg/mL 固化)+CD28功能性抗体(2 µg/mL 可溶) 5hr	Brefeldin A	MP1-22E9
IFN-gamma	小鼠脾脏	ConA(3 µg/mL)(2d)/IL-2(20 ng/mL)+IL-4(20 ng/mL)(3d)	2d/3d	CD3功能性抗体(10 µg/mL 固化)+CD28功能性抗体(2 µg/mL 可溶) 5hr	Brefeldin A	XMG1.2
IL-1 alpha	小鼠PEC	mIFNγ(100 ng/mL)(2hr)/LPS(100 ng/mL)(22hr)	2hr/22hr	—	Brefeldin A	ALF-161
IL-1 beta	小鼠PEC	LPS(100 ng/mL)(22hr)	22hr	—	Monensin	NJTEN3
IL-2	小鼠脾脏	ConA(3 µg/mL)(2d)/IL-2(20 ng/mL)+IL-4(20 ng/mL)(3d)	2d/3d	CD3功能性抗体(10 µg/mL 固化)+CD28功能性抗体(2 µg/mL 可溶) 5hr	Brefeldin A	JES6-5H4
IL-4	小鼠脾脏	Th2极化	6d	PMA(50 ng/mL)+ Ionomycin(1 µg/mL)5hr	Brefeldin A	BVD6-24G2, 11B11
IL-5	小鼠脾脏CD4	ConA(3 µg/mL)(2d)/IL-2(20 ng/mL)+IL-4(20 ng/mL)(3d)	2d/3d	CD3功能性抗体(10 µg/mL 固化)+CD28功能性抗体(2 µg/mL 可溶) 5hr	Brefeldin A	TRFK5
IL-6	小鼠PEC	LPS(100 ng/mL)(22hr)	22hr	—	Monensin	MP5-20F3
IL-10	小鼠脾脏	ConA(3 µg/mL)(2d)/IL-2(20 ng/mL)+IL-4(20 ng/mL)(3d)	2d/3d	CD3功能性抗体(10 µg/mL 固化)+CD28功能性抗体(2 µg/mL 可溶) 5hr	Brefeldin A	JES5-16E3, JES5-2A5
IL-12/IL-23 (p40)	小鼠PEC	LPS(100 ng/mL)(22hr)	22hr	—	Brefeldin A	C17.8
IL-13	小鼠脾脏	Th2极化	6d	PMA(50 ng/mL)+ Ionomycin(1 µg/mL)5hr	Brefeldin A	eBio13A
IL-17A	小鼠脾脏	Th17极化	6d	PMA(50 ng/mL)+ Ionomycin(1 µg/mL)5hr	Monensin	eBio17B7
IL-17F	小鼠脾脏	Th17极化	6d	PMA(50 ng/mL)+ Ionomycin(1 µg/mL)5hr	Monensin	eBio18F10
IL-21	小鼠脾脏	Th17极化	9d	PMA(50 ng/mL)+ Ionomycin(1 µg/mL)5hr	Monensin	FFA21
IL-22	小鼠脾脏	Th17极化	12d	PMA(50 ng/mL)+ Ionomycin(1 µg/mL)5hr	Brefeldin A	IL22JOP
IL-23 p19	小鼠骨髓	mGM-CSF(40 ng/mL)	8d	LPS(1 µg/mL)(24 hr)	Monensin	fc23cpg
MCP-1/CCL2	小鼠PEC	LPS(100 ng/mL)(24hr)	24hr	—	Brefeldin A	2H5
TNF-α	小鼠脾脏	ConA(3 µg/mL)(2d)/IL-2(20 ng/mL)+IL-4(20 ng/mL)(3d)	2d/3d	CD3功能性抗体(10 µg/mL 固化)+CD28功能性抗体(2 µg/mL 可溶) 5hr	Brefeldin A	MP6-XT22, TN3-19

注: 小鼠PEC=巯基乙醇酸盐诱导的小鼠腹膜巨噬细胞; ConA=伴刀豆球蛋白A; Ionomycin=离子霉素; LPS=脂多糖; PMA=佛波酯; 2d=孵育2天; 5hr=孵育5小时。

人细胞因子: 流式细胞内染色快速指南

人细胞因子	细胞来源	活化条件	孵育时间	再刺激条件	蛋白转运抑制剂	抗体克隆
G-CSF	PBMC	LPS(1 µg/mL)	24hr	—	Monensin	8F5CSF
GM-CSF	PBMC	PMA(30-50 ng/mL)/Ionomycin(1 µg/mL)	5hr	—	Monensin	BVD2-21C11
IFN-γ	PBMC	PMA(30-50 ng/mL)/Ionomycin(1 µg/mL)	5hr	—	Brefeldin A	4S.B3
IL-1 α	PBMC	LPS(1 µg/mL)	24hr	—	Monensin	364/3B3-14, CRM8
IL-1 β	PBMC	LPS(100 ng/mL)	4hr	—	Brefeldin A	CRM56
IL-1RA	PBMC	LPS(100 ng/mL)	24hr	—	Brefeldin A	CRM17
IL-2	PBMC	PMA(30-50 ng/mL)/Ionomycin(1 µg/mL)	4-6hr	—	Brefeldin A	MQ1-17H12
IL-4	PBMC	PMA(30-50 ng/mL)/Ionomycin(1 µg/mL)	4-6hr	—	Brefeldin A	8D4-8
IL-5	CD4	Th2极化培养物	6d	PMA(50 ng/mL)+ Ionomycin(1 µg/mL)(5hr)	Brefeldin A	TRFK5, JES1-5A10
IL-6	PBMC	LPS(100 ng/mL)	24hr	—	Brefeldin A	MQ2-13A5
IL-9	CD4	Th2极化培养物	6d	PMA(50 ng/mL)+ Ionomycin(1 µg/mL)(5hr)	Monensin	MH9A4
IL-10	CD4	Th2极化培养物	6d	PMA(50 ng/mL)Ionomycin(1 µg/mL)(5hr)	Monensin	JES3-9D7
IL-12/IL-23 (p40)	PBMC	Human IFN gamma(100 ng/mL)(2hr)/ LPS(100 ng/mL)(22hr)	2hr/22hr	-	Brefeldin A	C8.6
IL-13	CD4	CD3功能性抗体(10 µg/mL 固化)+CD28功能性抗体(2 µg/mL 可溶)+ IL-2(10ng/mL)+ IL-4(20ng/mL) (2d); IL-2(10ng/mL)+ IL-4 (20ng/mL) (3d)	2d/3d	PMA(5 ng/mL)+ Ionomycin(500 µg/mL)(4hr)	Brefeldin A	PVM13-1
IL-17A	PBMC	Th17极化培养物	6d	PMA(50 ng/mL)+ Ionomycin(1 µg/mL)(5hr)	Brefeldin A	eBio64CAP17, eBio64DEC17
IL-21	PBMC	PMA(30-50 ng/mL)/Ionomycin(1 µg/mL)	4-7hr 或 12-18hr	—	Brefeldin A	eBio3A3-N2
IL-22	CD4	Th17极化培养物	6d	PMA(50 ng/mL)Ionomycin(1 µg/mL)(5hr)	Brefeldin A	IL22JOP
IL-23 p19	PBMC	hGM-CSF(40 ng/mL)+ hIL-4(40 ng/mL)	6d	LPS(1 µg/mL)(24hr)	Monensin	23dcdp
MCP-1/CCL2	PBMC	LPS(1 µg/mL)	24hr	—	Monensin	2H5, 5D3-F7
RANTES/CCL5	PBMC	LPS(1 µg/mL)	24hr	—	Monensin	VL1
TNF-α	PBMC	PMA(30-50 ng/mL)/Ionomycin(1 µg/mL)	5hr	—	Brefeldin A	MAb11
TNF-β	PBMC	Th1极化培养物	6d	PMA(50 ng/mL)+ Ionomycin(1 µg/mL)(5hr)	Monensin	359-81-11

注: Ionomycin=离子霉素; PMA=佛波酯; LPS=脂多糖; 2d=孵育2天; 5hr=孵育5小时。

流式胞内细胞因子染色指南 (续)

其他胞内蛋白: 流式细胞内染色快速指南

抗原	抗体克隆
小鼠/大鼠Bcl-2	10C4
小鼠CTLA-4 (CD152)	UC10-4B9
人CTLA-4 (CD152)	14D3
人/小鼠/大鼠细胞色素C	6H2
人Foxp3	PCH101
小鼠Foxp3	FJK-16s
GATA3	
小鼠/人颗粒酶B	eBioGB
小鼠Langerin (CD207)	eBioRMUL.2
人Nanog	hNanog.1
人PCNA (增殖细胞核抗原)	PC10
小鼠穿孔素	eBioOMAK-D
人穿孔素	dG9
RORγ	
小鼠SLP-76	MS76
人SLP-76	HS76
人/小鼠T-bet	eBio4B10 (4B10, 4-B10)
人TLR3	TLR3.7
小鼠TLR9	M9.D6
人TLR9	eB72-1665
小鼠/人ZAP-70	1E7.2

仅供研究使用。不可用于诊断操作。

介绍

Invitrogen™ UltraComp eBeads™系列微球可与人、兔、小鼠、大鼠和仓鼠更多物种来源的抗体发生反应，并且不依赖于免疫球蛋白轻链结合。每滴微球溶液中含有两种微球：阳性群微球可捕获小鼠、大鼠或仓鼠等的抗体，而阴性群微球则不与抗体发生反应。向微球中加入荧光标记抗体后，流式结果图中会出现明显的阳性和阴性两群实验结果；在多色流式实验中，双峰分布信号可用于单色补偿对照。

UltraComp eBeads系列微球（货号01-3333，货号01-2222）可以广泛应用多种流式荧光染料，兼容由紫外（355 nm）、紫色（405 nm）、蓝色（488 nm）、绿色（532 nm）、黄绿色（561 nm）和红色（633-640 nm）激光激发的所有荧光染料。

尤其是UltraComp eBeads Plus流式补偿微球（货号01-3333）允许用于更多种属的流式抗体的补偿调节，包括人源抗体和兔源抗体；它还优化了紫激光聚合物染料的使用，如Brilliant Violet 785/786、Brilliant Violet 711、Super Bright 780和Super Bright 702标记的抗体。

注

使用本实验方案进行细胞分离需使用实验方案中提到的各项产品，不建议更换不同产品。

实验方案

材料

- UltraComp eBeads Plus流式补偿微球（货号01-3333）或UltraComp eBeads流式补偿微球（货号01-2222）
- 尚未染色的细胞
- 一抗（荧光染料直接标记）
- 流式细胞染色缓冲液（Flow Cytometry Staining Buffer，货号00-4222）
- 12 × 75 mm流式管

注

此方案也可使用OneComp eBeads（货号01-1111）。

补偿调节(续)

实验步骤

步骤I: 单色补偿对照的流式补偿微球使用步骤

1. 为实验中使用的每一种荧光染料标记一个空白流式管。
2. 将MLtraComp eBeads Plus流式补偿微球(货号01-3333)上下颠倒至少10次或涡旋混匀, 在每支流式管中加入1滴。
3. 每管中加入对应标记的1次推荐量或较少量的荧光抗体, 上下颠倒或涡旋混匀。
4. 在2-8°C或室温下, 避光孵育15-30分钟。
5. 每管加入2 mL流式细胞染色缓冲液(Flow Cytometry Staining Buffer, 货号00-4222), 室温下400-600 x g 离心3-5分钟, 弃掉上清液。
6. 用0.2-0.4mL流式细胞染色缓冲液(Flow Cytometry Staining Buffer)重悬微球。
7. 上下颠倒试管或充分涡旋样本, 上样到流式细胞仪分析。

步骤II: 设置补偿的常规步骤

1. 在流式细胞仪上检测尚未染色的细胞: 设置合适的前向散射光(FSC)和侧向散射光(SSC)以及荧光检测器(光电倍增管, 即PMT)的电压。
2. 检测任一管微球样本: 调整FSC/SSC的电压大小, 使微球出现在视野结果图中。
3. 分析每个单染微球样本, 确保阳性峰在正常范围内。如果阳性峰超出正常范围, 应调低PMT电压。所有单染管上样之后, 开始记录数据。
4. 分析记录每个单染样本进行补偿调节设置, 并保存补偿对照管数据。
5. 重新调整细胞样本的FSC/SSC, 获取样本数据。
6. 收集并保存样本数据。

注

UltraComp eBeads可以兼容含有这些内容物的染色缓冲液, 有PBS或HBSS、BSA或FBS蛋白以及叠氮化钠。请勿使用其他添加剂。

如需更多信息, 请联系技术支持部门lifescience-cn@thermofisher.com。

注

1 Test是指在100 μ L中染色细胞样本所使用的抗体量(μ g)。如果在阴性群微球信号区有高背景, 则可减少抗体用量, 建议不超过0.125 μ g。由于抗体结合阳性微球与抗体特异性无关, 因此无需滴定抗体的最佳用量, 建议每次在多数抗体混合物中使用0.03-1.0 μ g流式补偿微球。

注

当物种是山羊和绵羊时, 应使用细胞单染管和FMO对照, 不建议使用微球。

介绍

现在各种各样的流式仪器和流式染料允许进行越来越多色的流式检测实验, 而多色流式实验的优势包括同时检测单个细胞上的多个标记物、收集丰富的细胞实验数据以及最终更加精确鉴别细胞群 (图1)。再加上, 所需样本体积减少、样本检测通量提高, 使得流式细胞实验的效率明显提高。但是, 检测更多抗原和更多荧光染料使流式配色更加复杂, 同时更需注意配色优化、实验对照以及其他细节[1]。

在流式多色实验中, 最大挑战是选择合适的荧光染料, 同时还需兼顾荧光染料之间光谱重叠或荧光溢漏保持最少, 保证流式数据结果的高质量和准确性。请参考流式配色的相关文献[2-4]。

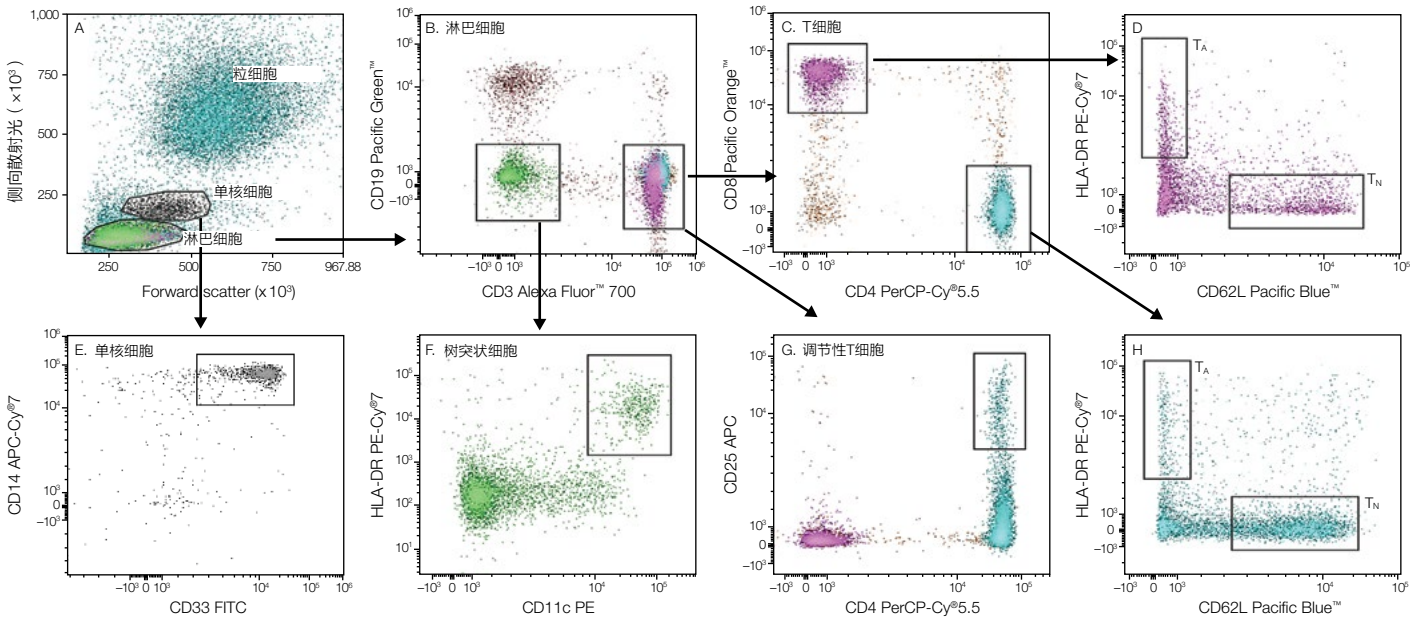


图1.使用Attune NxT声波聚焦流式细胞仪对外周血单个核细胞(PBMC)进行10参数免疫分型检测。根据前向散射光FSC和侧向散射光SSC对淋巴细胞和单核细胞设门(A)。在淋巴细胞中根据CD3表达圈出T细胞(B), 并进一步将其细分为CD4+和CD8+ T细胞亚群(C)。调节性T细胞可表达CD4和CD25(G), 它是维持机体免疫耐受的重要因素。CD62L将T细胞分为初始CD4+ T细胞和初始CD8+ T细胞(TN); HLA-DR可由活化的T细胞(TA)表达(D, H)。外周血中树突状细胞通常不表达T和B细胞谱系标志, 可表达CD11c和HLA-DR(F)。在散射光信号图中, 单核细胞位于淋巴细胞上方(A), 并且同时表达CD14和CD33(E)。

在设计流式配色方案时，重点关键要素如下：

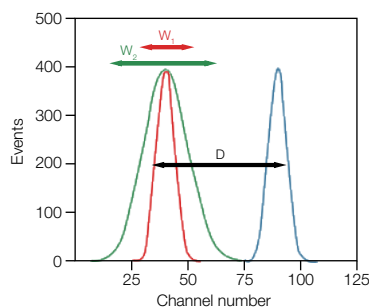
- 在流式配色之前，了解您的仪器配置（激光器和滤光片）。
- 弱表达抗原搭配较亮荧光染料，强表达抗原搭配较弱荧光染料。
- 荧光互相干扰的荧光染料用来标记不同细胞，然后对其分别设门分析。
- 流式多色方案中应包含细胞活性检测染料，排除死细胞和细胞碎片。
- 使用荧光光谱查看器 (thermofisher.cn/spectraviewer) 等工具，查看荧光染料之间的光谱重叠。
- 滴定抗体用量并不断优化，构建流式配色方案是反复斟酌衡量的过程。

确定荧光染料亮度

在流式细胞分析中，荧光染料的亮度不仅因它的量子产量和消光系数这些参数而变化，也受背景噪音信号影响。例如非特异性染色、细胞自发荧光以及仪器产生噪音等，这些会影响目标细胞群（阳性）和空白细胞群（阴性）的清晰分群。

通过信噪比 (Signal-to-noise ratio, S/N)，可以确定流式检测灵敏度以及阳性群与阴性群荧光信号差异，计算方式为阳性细胞群的荧光强度中位值 (MFI) 除以阴性细胞群的荧光强度中位值，来得出信噪比 (图2)。

但是，荧光染料的相对亮度不仅由细胞群荧光的强度差决定，还由阴性细胞群荧光强度分布程度来决定。Maecker等人认为[2]，计算染色指数 (Stain Index, SI) 时应根据以上两种参数计算 (图2)，用于比较同一抗体的不同荧光染料染色 (表1, 图3)。



$$\text{染色指数} = D / W$$

其中：

D 是阳性群与阴性群的中位值之差。

W 是阴性群的宽度，等于 $2 \times \text{rSD}$ 。

rSD 为标准差。

$$\text{信噪比} = \text{MFI (阳性群)} / \text{MFI (阴性群)}$$

其中：

MFI 为荧光强度中位值

图2. 染色指数 (Stain Index) 和信噪比的比较。

图中展示了信噪比相同的两群荧光信号，但其染色指数 (Stain Index) 不同，这是因为它们阴性峰的宽度不同 (W_1 窄 vs W_2 宽)。由于阴性峰宽度影响阳性和阴性信号的区分，因此染色指数常作为荧光染料亮度参数。

表1. 在CD4抗体 (克隆号53.5) 上不同荧光染料的染色指数。

亮度	CD4抗体上的荧光染料 (抗体货号)	激发波峰 (Ex, nm)	发射波峰 (Em, nm)	激光器	带通发射滤光片 (BP filter, nm)	染色指数†
高	APC (MHCD0405)	645	660	633	660/20	200.31
	PE (MHCD0404)	496, 565	575	488	585/42	158.46
	APC-Cy5.5 (MHCD0419)	650	690	633	710/50	108.97
	PE-Cy5.5 (MHCD0418)	496, 565	690	488	695/40	105.91
	Alexa Fluor 488 dye (MHCD0420)	495	519	488	525/50	91.72
中等	PE-Alexa Fluor 610 dye (MHCD0422)	488	628	488	620/10	70.71
	FITC dye (MHCD0401)	493	525	488	525/50	56.40
	PE-Cy7 (MHCD0412)	496, 565	774	488	780/60	53.70
	PE-Alexa Fluor 700 dye (MHCD0424)	496, 565	723	488	720/30	52.45
	TRI-COLOR dye (PE-Cy5) (MHCD0406)	496, 565	670	488	695/40	50.31
	PE-Texas Red dye (MHCD0417)	496, 565	613	488	695/40	40.85
	Qdot 605 nanocrystal (Q10008)	350	605	405	605/20	35.17
	APC-Alexa Fluor 750 dye (MHCD0427)	645	775	633	780/60	31.91
	Alexa Fluor 700 dye (MHCD0429)	696	719	633	710/50	24.85
	Qdot 655 nanocrystal (Q10007)	350	655	405	655/20	20.62
低	Qdot 705 nanocrystal (Q10060)	350	720	405	720/20	18.38
	Pacific Blue dye (MHCD0428)	410	455	405	450/50	14.61
	Alexa Fluor 405 dye (MHCD0426)	401	421	405	450/50	10.01
	PerCP (MHCD0431)	482	675	488	695/40	8.75
	Pacific Orange dye (MHCD0430)	400	551	405	585/42	6.06

†染色指数由BD™ LSR II流式细胞仪的6.1版FACSDiva™软件分析得到。

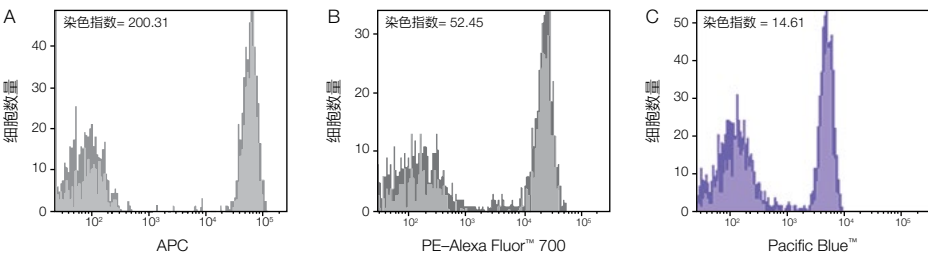


图3. 使用不同荧光染料标记的CD4抗体染色结果图。在氯化铵裂解后的人全血样本中，收集10,000个淋巴细胞，评估20种的Anti-human CD4抗体性能 (见表1)。为获得最大信噪比，对每种荧光抗体均进行了滴定和优化，结果为 (A) CD4-APC抗体亮度最高；(B) CD4-PE-Alexa Fluor 700抗体亮度中等；(C) CD4-Pacific Blue抗体亮度很低。图片左上角有每种荧光抗体的染色指数 (Stain Index)。

流式配色方案设计(续)

流式实用工具:

荧光光谱查看器Spectra Viewer, 流式配色工具Panel Builder

使用荧光染料光谱查看器(thermofisher.cn/spectraviewer), 选择合适的荧光染料。在输入仪器的激光器和滤光片配置(图4)后, 这里会展示每种荧光染料的激发光谱和发射光谱, 然后选择合适的荧光染料, 例如图5所示为流式5色方案。而且, 还可以查看荧光溢漏表格(Spillover table), 查看每个通道内每种染料之间的光谱重叠或荧光溢出(表2)。

使用Panel Builder流式配色工具(thermofisher.cn/order/panel-builder), 选择合适的荧光抗体。它可以简单、直观、灵活地设计流式配色方案, 满足不同的流式实验方案设计的需求。与荧光光谱查看器类似, 它既可展示荧光染料的激发光谱和发射光谱, 也能显示在该通道所有流式抗体, 使得构建多色流式检测方案更加方便, 最终轻松选择到合适的抗体。

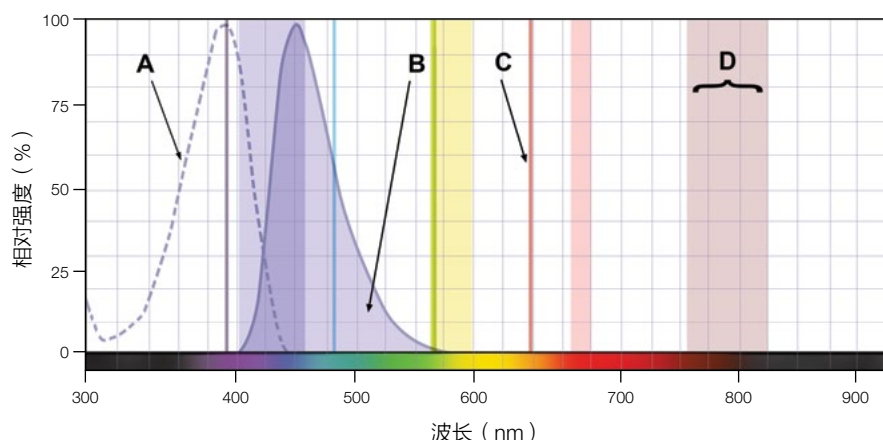


图4.荧光光谱查看器Spectra Viewer。同一荧光染料的激发光谱(A)和发射光谱(B), 激光激发波长(C), 带通发射滤光片波长(D)。

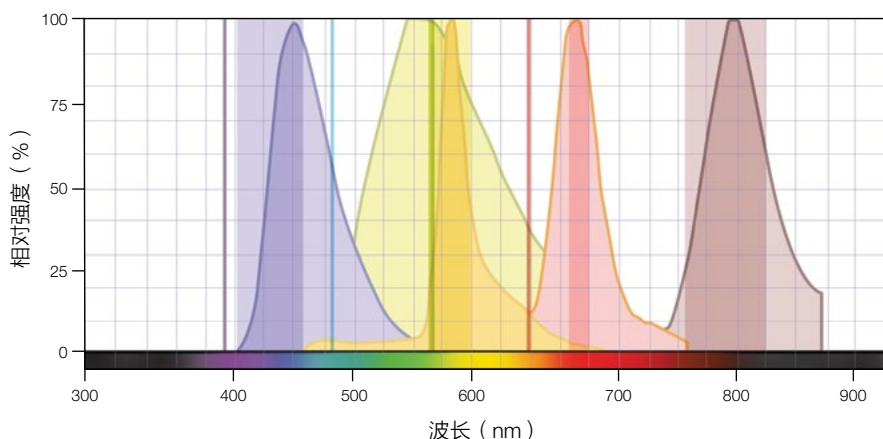


图5.荧光光谱查看器显示流式5色方案。这里使用了405 nm激光激发的Pacific Blue染料(紫色)、405 nm激光激发的LIVE/DEAD可固定细胞死活的黄色染料(黄色)、488 nm激光激发的R-藻红蛋白(PE, 橙色)、561 nm激光激发的PE-Alexa Fluor 647(红色)及633 nm激光激发的APC-Alexa Fluor 750(棕色)的发射光谱。所示激光为405 nm(紫色)、488 nm(蓝色)、561 nm(黄色)和633 nm(红色)。

表2. 在荧光光谱查看器中, 这五种染料的荧光溢漏表格 (图5)

荧光染料	带通 (BP) 发射光滤光片 (nm)			
	440/50	574/26	670/14	780/60
Pacific Blue dye	48.2%	0.9%	0.0%	0.0%
LIVE/DEAD Fixable Yellow stain	0.2%	20.3%	2.2%	0.0%
PE (R-藻红蛋白)	0.0%	53.7%	1.2%	0.0%
Alexa Fluor 647-PE	0.0%	3.3%	28.9%	0.1%
Alexa Fluor 750-allophycocyanin	0.0%	0.0%	2.9%	66.1%

表中方案是基于Attune NxT流式细胞仪的滤光片配置而设计。

百分比是指使用该滤光片检测到荧光信号的效率。比如, 574/26 nm带通滤光片分别收集20.3%的LIVE/DEAD可固定细胞死活黄色染料 (LIVE/DEAD Fixable Yellow Stain) 荧光以及53.7%的PE荧光染料的荧光, 但它们的荧光光谱实际上不会发生重叠, 因为它们是由不同激光器激发的: LIVE/DEAD染色液由405 nm激光器激发而非488 nm激光器, PE由488 nm激光器激发而非405 nm激光器。

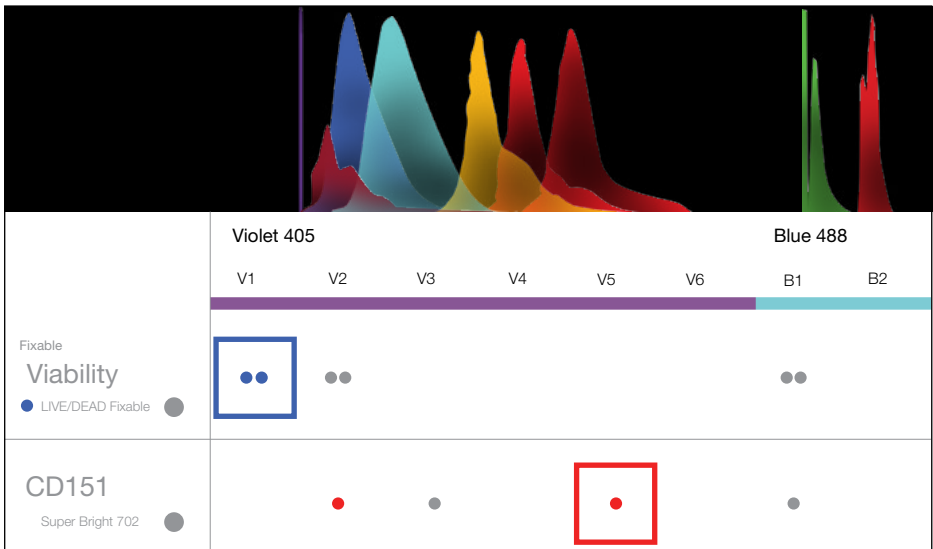


图6 Panel Builder流式配色工具页面

参考文献

1. Nat Rev Immunol (2004) 4:648–655.
2. Cytometry A (2004) 62:169–173.
3. Cytometry A (2006) 69:1037–1042.
4. Clin Lab Med (2007) 27:469–485.

CellBlox™ 封闭缓冲液使用方案

产品描述

Invitrogen™ CellBlox™ 封闭缓冲液 (Invitrogen™ CellBlox™ Blocking Buffer) 是非蛋白类溶液, 可以阻止Invitrogen™ NovaFluor™ 标记物与部分细胞发生非特异性结合, 避免背景信号影响。CellBlox 封闭缓冲液也用于花菁素染料 (Cyanine dyes) 或花菁素串联染料 (Cyanine-tandem dyes) 染色时, 也可以封闭荧光染料与单核细胞、巨噬细胞和其他类型细胞的非特异性相互作用, 降低背景信号。

使用CellBlox 封闭缓冲液时, 仅需对染色方案进行部分调整, 即在加入抗体之前, 将5 μL CellBlox 封闭缓冲液直接添加到100 μL含有 10^3 – 10^8 个细胞的悬液中; 也可以在抗体标记细胞之前, 按每个样本5 μL CellBlox 封闭缓冲液添加到抗体混合物中, 调整终染色体积为100μL。

实验方案

材料

- CellBlox 封闭缓冲液 (货号B001T02F01、B001T03F01、B001T06F01)
- 荧光染料标记的一抗
- 流式细胞染色缓冲液 (Flow cytometry staining buffer, 货号00-4222-26)
- 12 × 75 mm流式管或U型或V型底微孔板

重点注意事项

使用本实验方案进行细胞分离需使用实验方案中提到的各项产品, 不建议更换不同产品。

注

当使用NovaFluor染料时, 请搭配使用CellBlox 封闭缓冲液。

技术提示

- NovaFluor染料需配合CellBlox 封闭缓冲液使用, 降低染色背景。
- CellBlox 封闭缓冲液适用于很多荧光染料以及Invitrogen™ LIVE/DEAD™ Fixable Dead Cell Stains。
- CellBlox 封闭缓冲液可结合使用很多荧光标记抗体中, 用作单核细胞和巨噬细胞的封闭溶液。
- CellBlox 封闭缓冲液可与其他封闭试剂兼容, 例如Fc Block、封闭蛋白、Brilliant Stain Buffer和Super Bright Complete染色缓冲液。
- 抗体标记补偿微球时无需添加CellBlox 封闭缓冲液。

将CellBlox封闭缓冲液添加到抗体混合物中的使用步骤（首选方案）

1. 单细胞悬液制备: 请参考最佳细胞制备方案, thermofisher.cn/cellpreparation.

2. 每管或孔中添加含有 10^3 - 10^6 个细胞的细胞悬液。

3. 将每种抗体按滴定剂量制备抗体混合物, 加入样本前需充分混匀。

4. 按每个样本5 μ L CellBlox封闭缓冲液 (CellBlox Blocking Buffer, 货号B001T03F01) 添加到抗体混合物中, 将终体积调整为100 μ L。例如, 制备10份样本的抗体混合物, 需向抗体混合物中添加50 μ L CellBlox封闭缓冲液。

5. 将每份含有CellBlox封闭缓冲液的抗体混合物添加到各样本中, 调整染色终体积为100 μ L。

6. 在2-8°C或室温下, 避光孵育30分钟。

7. 每管加入2 mL的流式细胞染色缓冲液 (Flow Cytometry Staining Buffer), 室温下400-600 x g离心5分钟, 弃掉上清液。

8. 重复步骤7。

9. 使用适当体积的细胞染色缓冲液 (Flow Cytometry Staining Buffer) 重悬细胞。

10. 上样到流式细胞仪, 分析样本。如需继续染色细胞内靶标, 请参考最佳流式胞内抗原染色方案, thermofisher.cn/Intracellularstaining。

CellBlox™ 封闭缓冲液使用 方案 (续)

将CellBlox封闭缓冲液添加到混合细胞样本中的使用步骤 (备选方案1)

1. 单细胞悬液制备: 请参考最佳细胞制备方案, thermofisher.cn/cellpreparation。
2. 按每份含有 10^3 – 10^8 个细胞的样本合并在一管中。
3. 按每个样本5 μ L CellBlox封闭缓冲液 (CellBlox Blocking Buffer) 添加到混合细胞样本中。
例如, 制备含10份小体积样本的细胞悬液, 需向细胞悬液中添加50 μ L CellBlox封闭缓冲液。
4. 将含有CellBlox封闭缓冲液的细胞悬液添加到每个样本管或孔中。
5. 将每种抗体按最佳用量添加到每个样本中, 调整染色终体积为100 μ L。
6. 在2–8°C或室温下, 避光孵育30分钟。
7. 每管加入2 mL的流式细胞染色缓冲液 (Flow Cytometry Staining Buffer), 室温下400–600 x g 离心5分钟, 弃掉上清液。
8. 重复步骤7。
9. 使用适当体积的细胞染色缓冲液 (Flow Cytometry Staining Buffer) 重悬细胞。
10. 上样到流式细胞仪, 分析样本。如需继续染色细胞内靶标, 请参考最佳流式胞内抗原染色方案, thermofisher.cn/Intracellularstaining。

将CellBlox封闭缓冲液添加到单份细胞样本的方案（备选方案2）

1. 单细胞悬液制备: 请参考最佳细胞制备方案, thermofisher.cn/cellpreparation.

2. 每管或孔中添加含有 10^3 - 10^6 个细胞的细胞悬液。

3. 在细胞染色之前, 将5 μ L CellBlox封闭缓冲液 (CellBlox Blocking Buffer) 直接添加到每份样本中。

4. 将每种抗体按最佳用量添加到每个样本中, 调整染色终体积为100 μ L。

5. 2-8°C或室温下避光, 孵育30分钟。

6. 每管加入2 mL的流式细胞染色缓冲液 (Flow Cytometry Staining Buffer), 在室温下以400-600 x g 离心5分钟, 弃掉上清液。

7. 重复步骤6。

8. 使用适当体积的细胞染色缓冲液 (Flow Cytometry Staining Buffer) 重悬细胞。

9. 上样到流式细胞仪, 分析样本。如需继续染色细胞内靶标, 请参考最佳流式胞内抗原染色方案, thermofisher.cn/Intracellularstaining。



流式细胞术

细胞活性和凋亡



细胞活性检测

介绍

细胞活性检测可用来区分活细胞与死细胞、探究细胞的其他功能或治疗作用，或者在流式分析时排除死细胞群。因为排除死细胞能够实现更加清晰的细胞分群和精确识别目标细胞群，因此区分出死细胞和排除假阳性细胞是确保流式实验结果分析准确性的关键步骤。

细胞凋亡过程的特点是细胞特征发生特殊变化，其中包括DNA含量减少、线粒体膜电位丧失和细胞膜内脂质不对称性破坏。这些变化均可以借助灵敏且特异性的染料和试剂进行性标记，并通过流式细胞术检测。

基于膜完整性的细胞活性检测

Invitrogen™ LIVE/DEAD™ 可固定细胞活性染料 (LIVE/DEAD fixable dead cell stains) 在流式细胞术中用来区分活细胞和死细胞。在细胞膜受损的细胞中，染料与细胞内部和细胞表面的游离胺反应，产生很强的荧光染色信号。在活细胞中，染料仅与细胞表面的胺反应，这时荧光强度较低。活细胞群和死细胞群之间的荧光强度差距通常大于50倍，这种荧光强度差距在甲醛固定后仍然完全保留。Invitrogen™ LIVE/DEAD™ 可固定细胞活性染料 (LIVE/DEAD fixable dead cell stains) 能够对活细胞染色，且在固定后已标记的死活细胞的荧光强度仍然不变，对于流式的胞内免疫表型分析至关重要。

这些检测试剂盒仅占用流式细胞仪的一个通道，因此LIVE/DEAD™ 可固定细胞活性试剂盒 (LIVE/DEAD fixable dead cell stains) 的荧光染料在多色流式实验中兼容性很高 (参见第67页的表格)；在所使用的流式细胞仪中，选取哪个通道适合检测这些荧光染料，可能因仪器配置不同而发生变化。

以下实验方案用于：

- 使用流式细胞仪鉴别活细胞群和死细胞群

实验方案所需材料：

- 培养细胞
- LIVE/DEAD™ 可固定细胞活性染料 (LIVE/DEAD fixable dead cell stains) (如LIVE/DEAD™ 可固定绿色细胞活性染料试剂盒LIVE/DEAD Fixable Green Dead Cell Stain Kit [货号 L23101])
- 流式细胞仪

注

ArC™ 胺反应补偿微球试剂盒：
Invitrogen™ ArC™ 胺反应补偿微球试剂盒ArC™ Amine Reactive Compensation Bead Kit [货号 A10346] 可以用来矫正可固定细胞活性染料与其他标准荧光染料之间的光谱重叠，用来搭配LIVE/DEAD™ 可固定细胞活性试剂 (LIVE/DEAD fixable dead cell stains)。这种补偿微球中含有两种聚苯乙烯微球：其中ArC反应性微球，可与LIVE/DEAD™ 可固定细胞活性染色试剂盒LIVE/DEAD fixable dead cell stains中的所有荧光染料发生反应；阴性对照微球则不发生反应。当与LIVE/DEAD™ 可固定细胞活性染料LIVE/DEAD fixable dead cell stains进行染色后，这两种微球分别显示阴性群和阳性群，用来更准确地设置补偿。

细胞活性检测 (续)

实验方案

1. 将试剂管中的染料解冻。
2. 向管中加入50μL DMSO来溶解LIVE/DEAD™ 可固定细胞活性染料 (LIVE/DEAD fixable dead cell stains)。
3. 将细胞样本离心, 弃掉上清液, 样本所含细胞数需至少 1×10^6 个细胞。
4. 用1 mL PBS对细胞洗涤一次。
5. 在1 mL PBS中重悬细胞。
6. 细胞计数并使用PBS将浓度调为 1×10^6 个细胞/mL。
7. 向细胞悬液中加入1μL溶解后的染料并混合均匀。
8. 在室温下孵育30分钟或在冰上孵育30分钟, 避光。
9. 用1 mL PBS对细胞洗涤一次, 然后在900μL PBS中重悬细胞。
10. 加入100μL 37%的甲醛。
11. 在室温下孵育15分钟。
12. 用1 mL含有1%牛血清白蛋白的PBS洗涤一次, 然后在1 mL含有1%牛血清白蛋白的PBS中重悬细胞。
13. 在流式细胞仪上选择合适的激发光和检测通道进行分析。

注

若无需固定细胞, 则可以跳过第9-12步。相应地, 用1 mL含有1%牛血清白蛋白的PBS洗涤两次, 然后在1 mL含有1%牛血清白蛋白的PBS中重悬细胞。

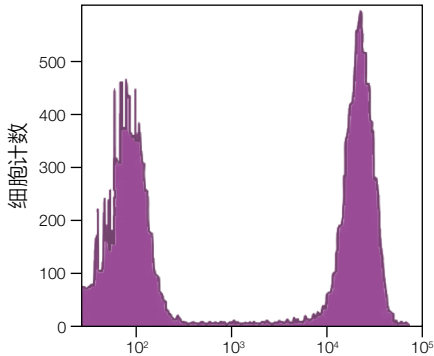
LIVE/DEAD™ 染料发射光谱特征

LIVE/DEAD 荧光染料	激发激光	Ex*	Em*
LIVE/DEAD Fixable Blue stain	UV	350	450
LIVE/DEAD Fixable Violet stain	405	416	451
LIVE/DEAD Fixable Lime stain	405	405	506
LIVE/DEAD Fixable Aqua stain	405	367	526
LIVE/DEAD Fixable Yellow stain	405	400	575
LIVE/DEAD Fixable Green stain	488	495	520
LIVE/DEAD Fixable Olive stain	488	480	557
LIVE/DEAD Fixable Orange stain	561	580	602
LIVE/DEAD Fixable Red stain	561	595	615
LIVE/DEAD Fixable Far Red stain	633/635	650	665
LIVE/DEAD Fixable Scarlet stain	633/635	700	775
LIVE/DEAD Fixable Near-IR (775) stain	633/635	750	775
LIVE/DEAD Fixable Near-IR (780) stain	633/635	750	780
LIVE/DEAD Fixable Near IR (876) stain	808	840	876

*荧光激发波长 (Ex) 和发射波长 (Em) 近似值, 单位: nm。

技术提示

- 尽快使用染料溶液, 最好在重溶后的几小时内使用。
- 细胞浓度应为 1×10^4 - 1×10^6 个细胞/mL。
- 染色后, 洗涤是可选步骤。
- 固定后细胞染色仍然保持不变, 但固定不是必须步骤。
- 缓冲液中的蛋白浓度应 $<1\%$



使用LIVE/DEAD™ 可固定紫色细胞活性染色试剂盒 (LIVE/DEAD Fixable Violet stain) 在流式细胞术中区分活细胞群和死细胞群

Annexin V细胞凋亡检测

介绍

Annexin V细胞凋亡检测方案是流式细胞术检测细胞凋亡常用方法。在以下实验方案中，建议使用相应的流式检测试剂盒。请参阅Annexin V染色实验方案，确定常规实验条件，避免假阳性，或查看赛默飞Annexin V产品选择指南。

流式检测Annexin V细胞凋亡实验方案

- Annexin V染色实验方案
- 同时使用可固定细胞活性染料的Annexin V染色实验方案
- 同时细胞表面和胞内染色的Annexin V染色实验方案

Annexin V染色实验方案

材料

- Annexin V细胞凋亡检测试剂盒Annexin V Apoptosis Detection kit (如赛默飞Annexin V试剂盒)，每个试剂盒均有一支Annexin V偶联物。
- 10X 结合缓冲液 (10X Binding buffer)
- eFluor 450 (货号88-8006-72, 88-8006-74)
 - FITC (货号BMS500FI-300, 88-8005-72, 88-8005-74)
 - PerCP-eFluor 710 (货号88-8008-72, 88-8008-74)
 - PE (货号88-8102-72, 88-8102-74)
 - PE-Cyanine7 (货号88-8103-72, 88-8103-74)
 - APC (货号88-8007-72, 88-8007-74)
- 12 × 75 mm 圆底流式管
- 1X PBS

注

实验方案适用于方案中提到的产品，不建议更换其他产品。

常规注意事项

- 由于Annexin V与磷脂酰丝氨酸(PS)相互作用具有钙依赖性，因此要注意在Annexin V实验中需避免使用含有EDTA或其他钙螯合剂的缓冲液。
- Annexin V仅在细胞质膜完整时作为细胞凋亡的标志物，因为破坏细胞质膜的完整性将使Annexin V与细胞内的磷脂酰丝氨酸结合。

注

如上文所述，Annexin V通过结合磷脂酰丝氨酸 (PS) 鉴别细胞是否在凋亡过程中。即使在细胞凋亡后期，细胞膜丧失完整性，Annexin V还能结合到胞内的PS。但碘化丙啶 (PI)、7-AAD这些活性染料不能鉴别凋亡早期细胞，因其质膜不能染色。因此，凋亡早期阶段细胞表现为Annexin V阳性，活性染料阴性；凋亡晚期阶段细胞和坏死细胞都可发现Annexin V和活性染料阳性；这都说明Annexin V能够鉴定细胞早期凋亡。

实验步骤

1. 将1份体积10X 结合缓冲液10X Binding buffer与9份体积蒸馏水混合, 制备1X 结合缓冲液 (Binding buffer)。
2. 收集细胞。
3. 用1X PBS洗涤细胞一次, 然后用1X结合缓冲液洗涤细胞一次。
4. 用1X结合缓冲液重悬细胞至 $1-5 \times 10^6$ 个细胞/mL。
5. 向100 μ L细胞悬液中加入5 μ L荧光染料偶联的Annexin V试剂。
6. 在室温下孵育10-15分钟, 避光。
7. 加入2 mL 1X结合缓冲液, 并在室温下400–600x g离心5分钟。弃掉上清液。
8. 在200 μ L 1X结合缓冲液中重悬细胞。
9. 加入5 μ L碘化丙啶 (PI) 染色液, (Propidium Iodide (PI) Staining Solution, 货号00-6990) 或7-AAD细胞活性染色液 (7-AAD Viability Staining Solution, 货号00-6993) 然后在冰上或室温下孵育5-15分钟。
10. 用流式细胞仪进行分析。

注

在数据采集过程中, PI和7-AAD必须保留在缓冲液中。加入PI或7-AAD后不能洗涤细胞。

注

细胞应在加入细胞活性染料开始孵育的4小时内上机分析, 因为细胞长期在PI或7-AAD中会对细胞活性产生影响。请在2-8°C下避光存放, 直到上机分析。

Annexin V细胞凋亡检测(续)

同时使用可固定活性染料的Annexin V染色方案

材料

- 可固定活性染料, 如LIVE/DEAD™ 可固定细胞活性试剂盒LIVE/DEAD fixable dead cell stains (参见第61页的表格)
- Annexin V 细胞凋亡检测试剂盒Annexin V Apoptosis Detection kit (如赛默飞Annexin V试剂盒), 每个试剂盒均有一支荧光素偶联的Annexin V试剂。
- 10X 结合缓冲液10X Binding buffer
- eFluor 450 (货号88-8006-72, 88-8006-74)
 - FITC (货号BMS500FI-300, 88-8005-72, 88-8005-74)
 - PerCP-eFluor 710 (货号88-8008-72, 88-8008-74)
 - PE (货号88-8102-72, 88-8102-74)
 - PE-Cyanine7 (货号88-8103-72, 88-8103-74)
 - APC (货号88-8007-72, 88-8007-74)
- 流式染色缓冲液Flow Cytometry Staining Buffer (货号00-4222)
- 1X PBS (不含叠氮化物且不含血清/蛋白的PBS)
- 12 × 75 mm圆底流式管

实验步骤

1. 将1份体积10X结合缓冲液与9份体积蒸馏水混合, 制备1X结合缓冲液。

2. 用不含叠氮化物且不含血清/蛋白的PBS洗涤细胞两次。

3. 在不含叠氮化物且不含血清/蛋白的PBS中重悬细胞至 $1-10 \times 10^6$ 个细胞/mL。

4. 加入1 μ L 可固定活性染料/ mL细胞悬液, 立即涡旋。

5. 在2-8°C下孵育30分钟, 避光。

6. 用流式染色缓冲液 (Flow Cytometry Staining Buffer) 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 $1-5 \times 10^6$ 个细胞/mL。

9. 向100 μ L细胞悬液中加入5 μ L荧光染料偶联的Annexin V试剂。

10. 1在室温下孵育10-15分钟, 避光。

11. 加入2 mL 1X结合缓冲液, 并在室温400–600x g下离心5分钟。弃掉上清液。

12. 在200 μ L 1X结合缓冲液中重悬细胞。

13. 使用流式细胞仪进行分析。

Annexin V细胞凋亡检测(续)

同时细胞表面和胞内染色的Annexin V染色方案

材料

- Foxp3/转录因子固定破膜染色液套件 (Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set (货号00-5523)) 或细胞内固定破膜缓冲液套件Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set (货号88-8824)
- 流式染色缓冲液 (Flow Cytometry Staining Buffer Set, 货号00-4222)
- Annexin V细胞凋亡检测试剂盒Annexin V Apoptosis Detectionkit (如赛默飞 Annexin V试剂盒), 每个试剂盒均有一支荧光素偶联的Annexin V试剂。
- 10X 结合缓冲液 (10X Binding buffer)
- eFluor 450 (货号88-8006-72、88-8006-74)
 - FITC (货号BMS500FI-300, 88-8005-72, 88-8005-74)
 - PerCP-eFluor 710 (货号88-8008-72, 88-8008-74)
 - PE (货号88-8102-72, 88-8102-74)
 - PE-Cyanine7 (货号88-8103-72, 88-8103-74)
 - APC (货号88-8007-72, 88-8007-74)
- Fixable Viability Dye eFluor 660 (货号65-0864-14、65-0864-18)、Fixable Viability Dye eFluor 506 (货号65-0866-14、65-0866-18) 或Fixable Viability Dye eFluor 780 (货号65-0865-14、65-8065-18)
- 12×75 mm圆底流式管
- 1×PBS (不含叠氮化物且不含血清/蛋白的PBS)

注

建议不要将Fixable Viability Dye eFluor 450与Annexin V细胞凋亡检测试剂盒一起使用。

实验步骤

1. 将1份体积10X结合缓冲液与9份体积蒸馏水混合, 制备1X结合缓冲液。

2. 染色细胞表面抗原。请参阅**流式细胞术的细胞表面靶标染色**, 实验方案详情参见 thermofisher.cn/surfacetargetsflow。

3. 用不含叠氮化物且不含血清/蛋白质的PBS中洗涤细胞两次。

4. 在不含叠氮化物且不含血清/蛋白质的PBS中重悬细胞至 $1-10 \times 10^6$ 个细胞/mL。

5. 加入1 μ L可固定活性染料Fixable Viability Dye / mL细胞悬液, 立即涡旋混匀。

6. 在2-8°C下孵育30分钟, **避光**。

7. 用流式细胞染色缓冲液 (Flow Cytometry Staining Buffer) 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 $1-5 \times 10^6$ 个细胞/mL。

10. 向100 μ L细胞悬液中加入5 μ L荧光染料偶联的Annexin V试剂。

11. 在室温下孵育10-15分钟, **避光**。

12. 用1X结合缓冲液洗涤细胞一次。

13. 染色细胞内抗原。**流式细胞分析细胞内抗原染色的实验方案**, 请参考thermofisher.cn/intracellularstaining。

14. 使用流式细胞仪进行分析。

喜树碱(Camptothecin)诱导细胞凋亡

介绍

与细胞凋亡相关的细胞死亡级联反应是复杂且动态的过程，可以通过多种检测形式进行评价。采用实验性细胞凋亡阳性对照可以在一定程度上提高数据分析的准确性，并可用来确认实验是否操作正确。虽然阳性对照不是必须项，但是这能够使实验操作更加规范。以下方案是关于细胞凋亡检测中阳性对照诱导的细胞凋亡实验方案，具体来说是使用喜树碱诱导细胞凋亡方案。

注

实验方案适用于方案中提及的产品，不建议更换其他产品。

喜树碱(Camptothecin)诱导的细胞凋亡实验方案

材料

- 容易诱导细胞凋亡的细胞系或原代细胞。
- 添加10% FBS的RPMI-1640培养基
- 在DMSO中制备1 mM的喜树碱储备液
- 组织培养瓶或组织培养板

实验步骤

1. 在所需的组织培养瓶或组织培养板中，用10% FBS在新鲜的RPMI-1640培养基将细胞混悬为浓度为 0.5×10^6 个/mL的细胞悬液。
2. 在细胞悬液中加入适量的1 mM喜树碱，使终浓度达到4–6 μ M。阴性对照是由DMSO等量稀释的细胞悬液。
3. 在37°C, 5% CO₂培养箱中孵育细胞，孵育时间为该细胞类型的最佳诱导时间。建议您在预实验中测试出最佳孵育时间，以了解该细胞类型对凋亡过程的敏感程度。
4. 通过离心收集细胞，并进行适合的检测以评价细胞凋亡的诱导结果。

注

成功诱导细胞凋亡的其他药物有：放线菌素D、蛭肠毒素、放线菌酮、地塞米松、5-氟尿嘧啶、羟基脲和星形孢菌素。

流式细胞术

细胞周期



活细胞中的DNA含量分析

介绍

研究活细胞中的DNA含量和在各细胞周期的分布有多种应用场景，如在物理、化学或生物因素影响下检测细胞生长状态、监测细胞凋亡以及研究肿瘤状况和抑制基因的机制。活细胞通常处于三个主要的细胞周期：G0/G1期（每个细胞都有一组成对染色体）、S期（DNA合成期，DNA含量不等）和G2/M期（细胞分裂之前，每个细胞都有两组完整的成对染色体）[1-4]。DNA含量可以由DNA特异性荧光染料进行测量，这些染料的发射激光信号强度与DNA含量成正比，然后流式分析可以得出不同细胞周期阶段的分布直方图。通常使用非通透性核酸染料对固定或破膜的细胞进行分析，但也可以使用通透性的核酸染料对活细胞进行分析。赛默飞提供很多用于固定细胞的染料，还有一些通透性的核酸染料可供选择。

Vybrant™ DyeCycle™ Violet stain染料是一种DNA特异结合、细胞膜渗透性染料，它可与双链DNA结合后发出荧光，由紫激光激发、可用于分析活细胞中的DNA含量。Vybrant DyeCycle Violet stain染料不仅兼容被广泛配置的紫激光（图1）激发，而且也可由紫外激光（UV）激发，发射波长为440 nm左右。

Vybrant DyeCycle Violet stain染色实验方案十分简单，只需将Vybrant DyeCycle Violet stain染料孵育悬浮细胞，并直接检测其荧光强度，无需离心或其他步骤。这种活细胞染料的染色也兼容同时检测细胞表型，甚至可根据DNA含量进行细胞分选。啮齿动物和人类干细胞会排出Vybrant DyeCycle Violet stain染料。因此可以通过紫光激发实现侧群细胞（Side population, SP）分析或分选[5]。

光谱特征

Vybrant DyeCycle Violet stain染料的荧光激发和发射光谱如图1所示，这个光谱是在样本中通过Vybrant DyeCycle Violet stain染料与DNA结合得到的。Vybrant DyeCycle Violet染料/DNA结合物的荧光激发波峰和发射波峰分别为369 nm和437 nm。

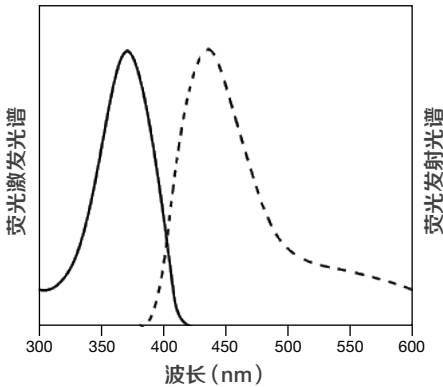


图1.Vybrant DyeCycle Violet stain染料在Tris-Borate-EDTA (TBE) Buffer (pH 8.3) 与DNA结合后的荧光激发光谱和发射光谱。

活细胞中的DNA含量分析 (续)

材料

表1. 产品信息

产品	规格	浓度	储存*	稳定性
Vybrant DyeCycle Violet stain染料 (货号 V35003)	200 µL	5 mM溶液 溶于去离子水	• 2-6°C • 请勿冷冻 • 避光	若按指示储存, 该试剂盒至少可稳定储存6个月。

实验次数: 基于1 mL测试体积, 试剂盒可用于200次左右流式实验。

荧光激发/发射波峰: 与DNA结合后, Vybrant DyeCycle Violet stain染料为369/437 nm。

安全警告

该产品的危险尚不明确。因Vybrant DyeCycle Violet stain与核酸结合, 将所以可能是诱变剂, 请谨慎使用! 该产品溶于DMSO溶液中, 这使有机分子可进入组织。使用该产品时, 选择合适的设备和恰当的实验操作, 避免因本产品引起的危险。若处理丢弃该试剂, 请遵守当地相关合规政策。

需要但未提供的材料

- 细胞和培养基
- 流式管

实验方案

以下优化后的染色实验方案使用Jurkat细胞 (人白血病T细胞系) 在37°C, 含10%胎牛血清的完全RPMI培养基中进行染色。实验方案适用于多数细胞类型。测试样本包含 1×10^6 个细胞/mL。实验中所用的培养基或缓冲液、细胞密度、细胞类型或其他因素都可能会对染色有影响, 因此在预实验中, 根据细胞类型、缓冲液和实验条件, 尝试使用梯度染料浓度, 从而确定最佳的染色实验方案。在每组实验中, 流式实验样本应使用相同细胞数量, 避免因样本间细胞数量不同引起荧光信号的显著差异。

如果Vybrant DyeCycle Violet stain染料与其他染料组合完成流式多色实验, 请先按说明指示将其他染料加到样本中, 包括洗涤步骤。Vybrant DyeCycle Violet stain染料是在上机前最后添加, 并且在上样分析前不要洗涤或固定样本。

常规事项

为了更好检测DNA含量来分析细胞周期, 需注意以下事项:

- 若无培养基, 建议使用Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS), 而非磷酸盐缓冲液。同时在整个实验中, 请勿使用玻璃容器。
- 染色前, 去除细胞悬液中的团块和杂质。在添加Vybrant DyeCycle Violet stain染料后, 在37°C下孵育细胞, 请勿洗涤或固定细胞。
- 使用细胞活性鉴定染料去除死细胞, 比如SYTOX™ Green、SYTOX™ Red或SYTOX™ AADvanced™细胞活性染料或者LIVE/DEAD™可固定细胞活性染料 (如Fixable Green/Red/ Far-Red/ Near-IR kit)。
- 提前确认流式细胞仪性能正常, 且根据实验目的, 建议在低流速下收集到足够的流式数据。在数据分析中, 通过设门排除团块、杂质及死细胞, 确保数据准确性; 在分析DNA含量时, 采用线性 (Linear) 信号查看及分析。还有, Alexa Fluor 488通道和PE通道可能需要补偿调节。
- 人类和啮齿动物干细胞会分泌出Vybrant DyeCycle Violet染料, 这是侧群细胞 (Side population, SP) 的检测原理; 可以使用维拉帕米 (Verapamil)、烟曲霉素 C (Fumitremogin C) 或其他药物阻断分泌过程, 可以更加准确地分析这些干细胞中的DNA含量。

活细胞中的DNA含量分析(续)

Vybrant DyeCycle Violet stain染色实验方案

以下实验方案经优化, 用于将完全培养基 (RPMI/ 10%胎牛血清) 中悬浮培养的Jurkat细胞在37°C下进行Vybrant DyeCycle Violet stain染色。

1. 从冰箱中取出Vybrant DyeCycle Violet stain (货号V35003) 染料, 恢复至室温。
2. 用完全培养基调整细胞浓度为 1×10^6 个细胞/mL, 按每管1 mL细胞悬液加到流式管中。
3. 在每管中加入1 μ L的Vybrant DyeCycle Violet stain染料并充分混匀, 使染料终浓度为5 μ M。
4. 在37°C下避光孵育30分钟。直至上机采集数据前将细胞始终保持在37°C条件。
5. 不要洗涤或固定样本, 直接上机检测样本。在流式细胞仪上, 使用405 nm左右激发波长和440 nm左右发射波峰分析样本 (图2), Vybrant DyeCycle Violet stain染料也可由紫外激光 (UV) 激发。

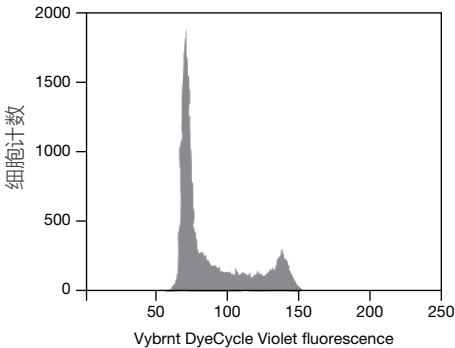


图2. Vybrant DyeCycle Violet stain染料染色 Jurkat活细胞后得出DNA含量分布直方图, G0/G1和G2/M周期的波峰被S期分隔开。该染料由紫光405 nm激发且使用440/40 nm带通滤光片检测。

参考文献

1. Current Protocols in Cytometry, 7.0.1–7.27.7 (2004)
2. Practical Flow Cytometry, 4th Ed., Shapiro HM, Ed. (2003)
3. Methods Mol Biol 281, 301 (2004)
4. Cytometry A 58, 21 (2004)
5. Stem Cells 25, 1029 (2007).

介绍

流式细胞术分析核酸是一种常见的应用。DNA含量的检测可以用来研究不同细胞群体的细胞周期和DNA倍体。在特定细胞群中, 有三个主要细胞周期: G0/G1期 (每个细胞含有一套成对的染色体)、S期 (DNA合成期, DNA含量不等) 和G2/M期 (细胞分裂之前, 每个细胞含有两套成对的染色体) [1-4]。可以使用DNA荧光染料对DNA进行检测, 信号强度与DNA含量成正比。然后对这些染色细胞群进行流式细胞分析, 获得各个细胞周期的直方图。

单参数DNA含量分析是一种成熟的检测方法, 广泛用于肿瘤学、细胞生物学和分子生物学的研究。通过流式细胞术可实现多色细胞周期研究, 可以替代488nm激光器使用其他激光器检测细胞周期, 这样使得常用的488nm激光器用于其他靶标的检测。FxCycle™ Violet染料 (4',6-二脒基-2-苯基吡啶二醋酸盐) 可被常见的紫色激光激发, 也可被紫外UV激光激发。在紫色激光上检测DNA含量, 则可以将常用的488 nm激光用于检测其他指标, 例如细胞周期蛋白、细胞周期蛋白依赖性激酶、细胞周期检查点、核蛋白和增殖标记物。FxCycle™ Violet染料优先结合dsDNA; 这可能与小沟中的AT碱基对相关[5]。FxCycle™ Violet染料与dsDNA结合, 可产生约20倍强度的荧光 [6]。

为了长期储存, 5瓶100 µg的固体染料可以在2-6°C下储存; 为方便起见, 小瓶溶于去离子水的储备液也在2-6°C下储存。

安全警告

FxCycle™ Violet染料造成的危害尚不完全明确。该染料是一种已知的诱变剂, 吸入和皮肤接触可能导致过敏, 并刺激眼睛、呼吸系统和皮肤。请勿吸入粉尘。如接触眼睛, 立即用大量清水冲洗并就医。穿戴适当的防护服、护目镜和手套。避免与皮肤和眼睛接触。按照相关地方法规处理试剂。

开始之前

实验中需要但未提供的试剂

- 去离子水
- 固定剂 (例如酒精或甲醛)
- 破膜剂 (例如Triton® X-100)
- 缓冲液, 如磷酸盐缓冲液 (PBS)

固定细胞的DNA含量分析(续)

制备储备液

向染料瓶中加入100 μL 去离子水, 浓度为1 mg/mL的FxCycle™ Violet染料储备液。充分混匀。于2–6°C下避光储存, 此条件下FxCycle™ Violet染料至少可稳定储存6个月。

光谱特性

FxCycle™ Violet染料的荧光激发和荧光发射光谱如图1所示。与dsDNA结合后, 荧光激发和发射波长分别为358/461 nm。FxCycle™ Violet染料可被流式细胞仪上常用的405 nm 紫色激光或者UV激光激发。

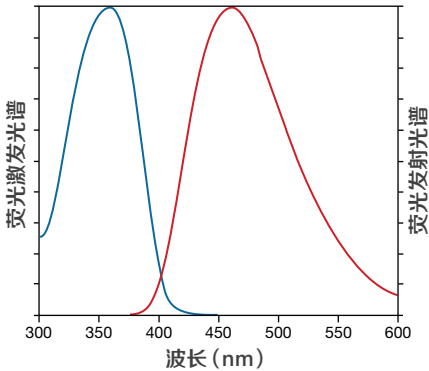


图1.FxCycle™ Violet染料与dsDNA结合后的荧光激发和发射光谱。

实验方案

以下方案使用Jurkat T细胞系研发, 但该方案适用于其他细胞类型。固定破膜剂、细胞密度、细胞类型变化和其他因素都可能影响染色效果。

在预实验中, 应对特定细胞类型进行测试, 梯度测试不同的染料浓度以获得最佳的染色浓度和实验条件。在进行细胞染色之前, 应尽量确保去除细胞中的固定剂, 但如有特殊需要, 可以在添加破膜剂的同时加入FxCycle™ Violet染料进行染色。对于同一组实验, 每个流式细胞样本的细胞数量应保持一致, 因为样本间细胞数量的差异会导致荧光信号的显著差异。

如果用FxCycle™ Violet染料结合其他染料标记的指标进行多色分析, 请先按照其他指标的生产商的说明(包括洗涤步骤)染色其他染料。FxCycle™ Violet染色应是最后一个步骤, 并且在流式细胞分析之前不要洗涤样本。

常规事项

为使DNA含量细胞周期分析达到最佳效果, 请注意以下事项:

- 染色前去除细胞悬液中的细胞团块
- 在使用前先确认流式细胞仪的功能正常
- 应用荧光通道的线性参数 (Linear) 放大信号检测DNA含量
- 在低流速下进行采集
- 分析并采集足量的事件 (events) 用于数据分析
- 当对细胞DNA含量分析细胞周期时, FxCycle™ Violet染料使用前必须先固定细胞

染色步骤

1. 收集细胞样本。
2. 根据经验证的最佳方法固定细胞。
3. 洗涤细胞。在进行细胞染色之前, 尽量将样本中的固定试剂去除干净。
4. 使用合适的缓冲液, 调节细胞样本浓度为 1×10^6 个细胞/mL。
5. 制备流式细胞样本, 使每个样本含有1 mL细胞悬液。如果实验需要可以选择性地加入破膜试剂进行破膜处理。
6. 向每个样本加入1 μ L FxCycle™ Violet (货号F10347) 染料并充分混匀。
7. 样本在室温或2–6°C下避光孵育30分钟。
8. 使用流式细胞仪分析样本: 使用405nm激光器和450/50带通或同等滤光片收集信号。
9. 图2显示了使用FxCycle™ Violet染料进行DNA含量细胞周期分析获得的结果示例。

注意

使用FxCycle™ Violet染料染色后, 请勿洗涤细胞

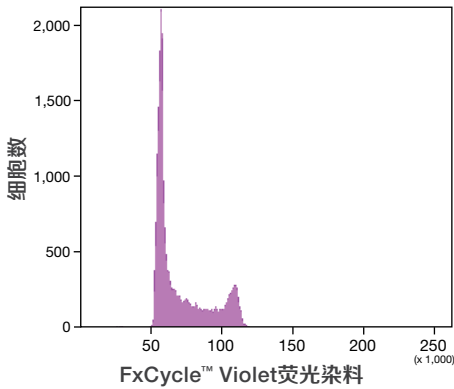


图2.HL-60早幼粒细胞经FxCycle™ Violet染料染色后获得的DNA含量直方图。HL-60细胞用酒精固定过夜、洗涤, 然后重悬于0.1% Triton® X-100/PBS/1% BSA中, 最后在室温下用FxCycle™ Violet染料染色30分钟。S期分布位于G0/G1和G2/M期直方图之间。使用450/50带通滤光片在405 nm激发光下进行分析。

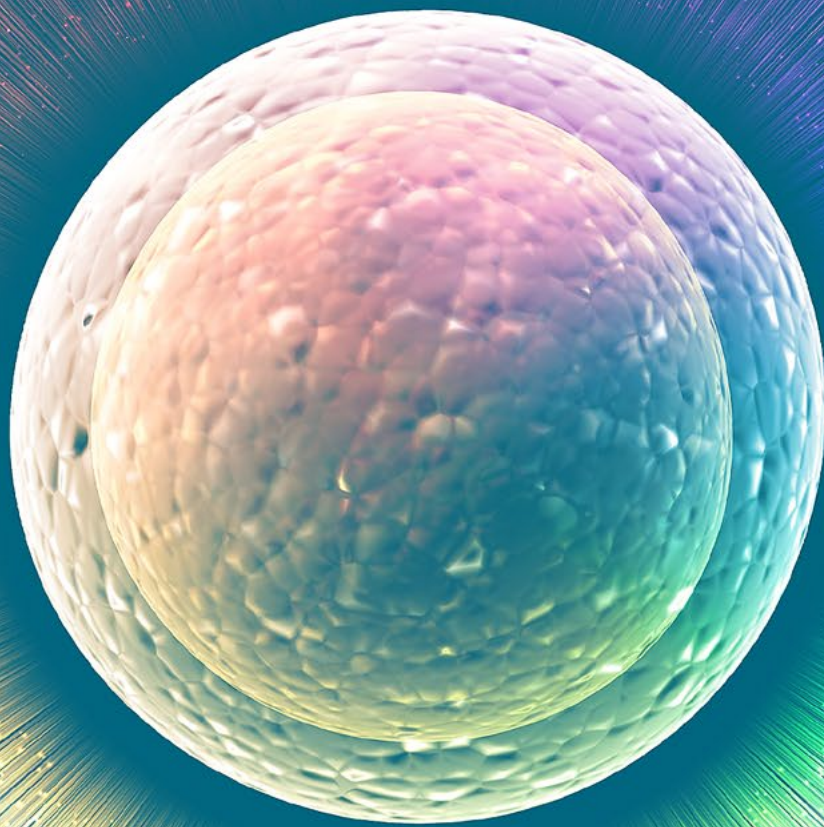
参考文献

1. Current Protocols in Cytometry, 7.0.1–7.27.7 (2004)
2. Practical Flow Cytometry, 4th Ed., Shapiro HM, Ed. (2003)
3. Methods Mol Biol 281, 301 (2004)
4. Cytometry A 58, 21 (2004)
5. Biochemistry 26, 4545 (1987)
6. Biochem Biophys Res Commun 170, 270 (1990).



流式细胞术

细胞增殖



细胞增殖检测

介绍

检测细胞增殖能力是评估细胞健康状况和基因毒性以及评价抗癌药物的基本方法。最准确的方法是直接检测DNA的合成。最初，通过掺入的放射性核苷（即³H-脱氧胸腺嘧啶核苷）可以检测DNA合成，随后基于抗体的溴脱氧尿苷（BrdU，核苷类似物）检测法取代了它。Click-iT™ Plus EdU细胞增殖试剂盒是替代BrdU检测的新方法。EdU（5-乙炔基-2'-脱氧尿苷）是脱氧胸腺嘧啶核苷类似物，在DNA合成活跃期掺入DNA中。该检测的原理是点击反应，这是铜催化的吡啶甲基叠氮化物和炔烃之间的共价反应。在这个反应中，EdU的乙炔基团提供炔烃，而吡啶甲基叠氮化物与Alexa Fluor™ 350染料、Alexa Fluor™ 488染料、Alexa Fluor™ 594染料、Alexa Fluor™ 647染料或Pacific Blue™染料结合。图1展示了标准流式细胞方法用于确定细胞群中S期细胞的百分比。

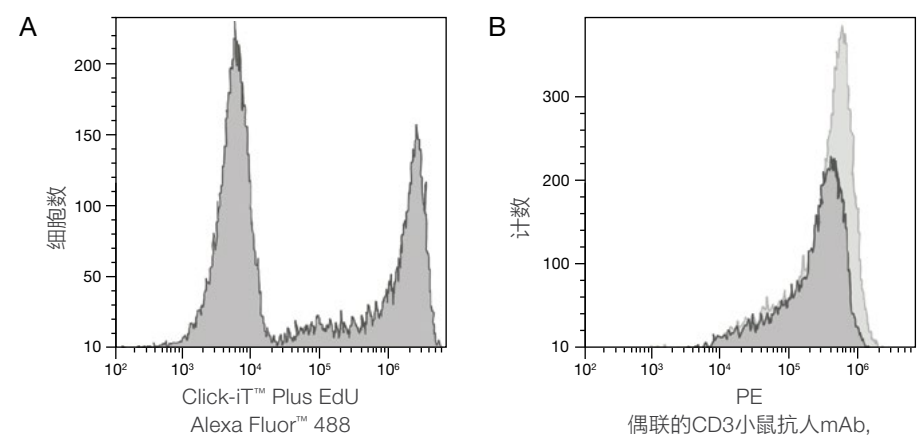


图1. Alexa Fluor™ 488 Click-iT™ Plus EdU细胞增殖试剂盒和抗人CD3小鼠mAb-PE检测Jurkat (人T细胞白血病细胞系) 细胞的荧光信号。用10μM EdU处理Jurkat细胞2小时，再用CD3小鼠抗人mAb,PE (货号MHCD0304) 染色并上机分析。上图的检测结果中，明显区分了掺入EdU的增殖细胞和未掺入EdU的非增殖细胞。图A显示了在Attune™ 声波聚焦流式细胞仪上使用488 nm激光器和530/30 nm带通滤光片，分析Alexa Fluor™ 488吡啶甲基叠氮化物标记的细胞频率；图B显示了使用561 nm激光器的细胞数据。直方图中黑色显示的是用CD3小鼠抗人mAb,PE和Click-iT™ Plus EdU Alexa Fluor™ 488吡啶甲基叠氮化物染色的细胞。直方图中灰色显示的是CD3小鼠抗人mAb, PE阳性对照细胞，该细胞经过相同处理但反应中不含铜。

细胞增殖检测 (续)

Click-iT™ Plus EdU标记的优势在于小分子的吡啶甲基叠氮染料在温和条件下可高效检测掺入的EdU。一般的醛基固定和去污剂破膜足以让Click-iT™ Plus进入DNA。与之相反, BrdU检测需要使用酸、加热或用DNase消化使DNA变性, BrdU才能暴露以使用抗BrdU抗体检测。当使用酸变性方法时, BrdU法处理样本会改变细胞周期信号的分以及导致抗原识别位点的破坏。相比之下, Click-iT™ Plus EdU细胞增殖试剂盒与细胞周期染料、R-PE、R-PE的串联染料和荧光蛋白(例如GFP、RFP和mCherry)兼容, 可以与针对表面和细胞内标记物的抗体进行多参数分析(图2)。

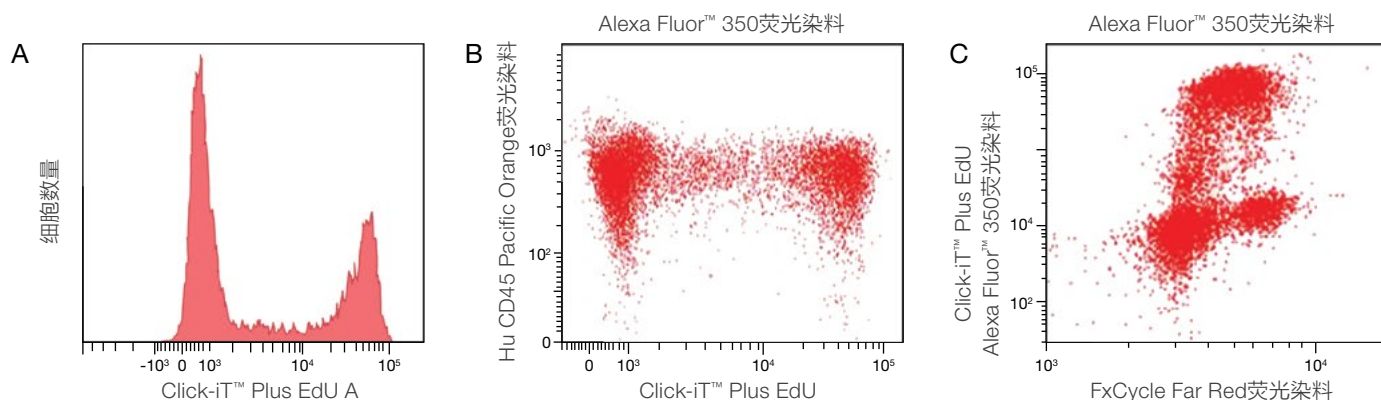


图2. Alexa Fluor™ 350 Click-iT™ Plus EdU细胞增殖试剂盒、CD45-Pacific Orange™和FxCycle™ Far Red 检测Jurkat (人T细胞白血病细胞系) 细胞。用10μM EdU处理Jurkat细胞2小时, 用CD45-Pacific Orange™ (货号MHCD4530) 染色进行检测。图片展示的是掺入EdU的增殖细胞和未掺入EdU的非增殖细胞。图A显示了使用UV激发和450/50 nm带通滤光片, Alexa Fluor™ 350吡啶甲基叠氮染料标记细胞的数据; 图B显示了使用405 nm激光激发和530/30 nm带通滤光片检测CD45-Pacific Orange™ 和使用UV激发和450/50 nm带通滤光片检测Alexa Fluor™ 350吡啶甲基叠氮染料的相同细胞; 图C显示了使用UV激发和450/50 nm带通检测Click-iT™ Plus EdU Alexa Fluor™ 350和FxCycle™ Far Red的双参数图。

材料

试剂盒中提供的组分

内容物	C10632	C10634	C10636	C10645	C10646	储存条件
EdU (组分A)	—	—	10 mg	—	—	• 2-8°C • 干燥剂 • 避光 • 请勿冷冻
Alexa Fluor™ 350吡啶甲基叠氮化物 (Alexa Fluor™ 350picolyl azide) ; 在DMSO中 (组分B)	—	—	—	130 μL	—	
Alexa Fluor™ 488吡啶甲基叠氮化物 (Alexa Fluor™ 488 picolyl azide) ; 在DMSO中 (组分B)	130 μL	—	—	—	—	
Alexa Fluor™ 594吡啶甲基叠氮化物 (Alexa Fluor™ 594 picolyl azide) ; 在DMSO中 (组分B)	—	—	—	—	130 μL	
Alexa Fluor™ 647吡啶甲基叠氮化物 (Alexa Fluor™ 647 picolyl azide) ; 在DMSO中 (组分B)	—	130 μL	—	—	—	
Pacific Blue™吡啶甲基叠氮化物 (Pacific Blue™ picolyl azide) ; 在DMSO中 (组分B)	—	—	130 μL	—	—	
二甲基亚砷 (DMSO) (组分B)	4.5 mL					
Click-iT™固定剂 (Click-iT™ fixative) (含4%多聚甲醛的PBS) (组分D)	5 mL					
Click-iT™可固定皂苷类破膜洗涤试剂10X (Click-iT™ fixative saponin-based permeabilization and wash reagent, 10X) , (组分E)	50 mL					
铜保护剂 (Copper protectant) , 100 mM水溶液组分F)	0.5 mL					
Click-iT™ EdU缓冲添加剂 (Click-iT™ EdU buffer additive) (组分G)	400 mg					

需要但未提供的材料

- 含1%牛血清白蛋白 (BSA) 的磷酸盐缓冲液 (PBS) , pH 7.1–7.4
- 缓冲液, 例如PBS、D-PBS或TBS
- 去离子水或18 MΩ纯净水
- 12 × 75 mm管, 或其他流式管

细胞增殖检测 (续)

操作步骤

试剂制备

1. 试剂盒平衡至室温。
2. 将4 mL的DMSO (组分C) 或水溶液 (PBS) 加入组分A中并充分混匀, 制成10 mM的EdU溶液。使用后, 剩余溶液储存在 $\leq -20^{\circ}\text{C}$ 条件下可稳定储存长达1年。
3. 将130 μL 的DMSO加入组分B中并充分混合, 制备Pacific Blue™吡啶甲基叠氮化物 (货号C10418)、Alexa Fluor™ 647吡啶甲基叠氮化物 (货号C10424) 或Alexa Fluor™ 488吡啶甲基叠氮化物 (货号C10425) 的工作液。使用后, 将剩余溶液储存在 $\leq -20^{\circ}\text{C}$ 条件下, 可稳定储存长达1年。
4. 将50 mL组分E加入450 mL 1% BSA的PBS溶液中, 以制备500 mL 1X Click-iT™ 皂苷类破膜洗涤剂可使用含1% BSA的PBS以1:10的比例稀释一定体积的组分E来制备更少量的组分。使用后, 将剩余的溶液储存在 $2-6^{\circ}\text{C}$ 条件下。按指示储存时, 1X溶液可稳定储存6个月, 10X溶液可稳定储存12个月。注: 组分E含有叠氮化钠 (参见安全警告)。
5. 向小瓶中加入2 mL去离子水并混匀, 直到Click-iT™ EdU buffer additive (组分G) 完全溶解, 以制备10X Click-iT™ EdU buffer additive储存液。使用后, 将剩余溶液储存在 $\leq -20^{\circ}\text{C}$ 条件下, 可稳定储存长达1年。

安全警告

- 在该试剂盒中, DMSO (组分B和C) 以溶液形式供应, 众所周知, DMSO有助于有机分子进入组织。处理含有DMSO的试剂时, 应选择适用于此类材料的设备 and 操作, 避免安全事故。按照所有相关的地方法规处置试剂。
- Click-iT™ 固定剂Click-iT™ fixative (组分D) 含有危化品多聚甲醛。使用时应采取适当的预防措施。
- Click-iT™ 皂苷类破膜洗涤剂reagent (组分E) 含有叠氮化钠, 在酸性条件下会产生剧毒的叠氮酸。丢弃前, 应在自来水中稀释叠氮化合物, 以避免管道中蓄积潜在的爆炸性沉积物。



Click-iT EdU Flow方案示意图

用EdU标记细胞

以下方案是使用Jurkat细胞（人T细胞系）和浓度为10 μ M的EdU开发，但该方案适用于任何细胞类型。培养基、细胞密度、细胞类型等这些因素可能会对标记造成影响。在预实验阶段，建议对特定细胞类型进行测试，梯度测试不同的EdU浓度以获得最佳的染色浓度和实验条件。如果目前使用BrdU法检测细胞增殖，则建议EdU的最适浓度首先从与使用BrdU接近的浓度开始尝试比较好。如果样本是全血，建议收集管采用肝素抗凝管。

6. 将细胞混悬在适当的培养基中，优化培养条件。在EdU孵育之前，温度改变或洗涤都会干扰细胞减缓细胞的增殖和染料掺入。

7. 将EdU工作液加入到培养基中并混匀达到适宜的终浓度。建议使用10 μ M的起始浓度孵育 1-2小时。如果孵育时间更长，建议降低浓度。如果孵育时间更短，可能需要更高的浓度。未经EdU处理的相同细胞群作为未染色的阴性对照。

8. 根据细胞类型优化孵育时间和条件。改变细胞孵育EdU的时间或用EdU对细胞进行脉冲标记，获取DNA合成和增殖的各项参数。脉冲标记的有效时间间隔和时长取决于细胞生长速率。

9. 如果需要进行抗体表面标记，则收集细胞并立即进行步骤10；否则继续进行步骤16。

细胞增殖检测（续）

细胞表面抗原染色（可选）

10. 用3 mL 含1% BSA的PBS洗涤细胞一次，离心得到细胞团，弃掉上清液。

11. 用含1% BSA的PBS重悬细胞至 1×10^7 个细胞/mL。

12. 将100 μ L的细胞悬液或全血样本加入流式管中。

13. 加入抗体并混匀（表1）。

14. 按照建议的时间和温度避光孵育。

15. 继续步骤16进行细胞固定。

注

在进行点击反应之前请勿使用PE、PE-串联染料或Qdot™抗体偶联物；直到步骤21-23使用这些荧光基团进行标记。

表1.Click-iT™ Plus EdU检测试剂与荧光染料的兼容性。

荧光染料	兼容性
R-藻红蛋白 (R-PE) 和基于R-PE的串联染料（即Alexa Fluor™ 610-RPE）	兼容，Alexa Fluor™ 594与R-PE-Cy7™串联染料除外
荧光蛋白 (GFP)	兼容
PerCP、别藻蓝蛋白 (R-APC) 和基于APC的串联染料（即Alexa Fluor™ 680-APC）	兼容
有机染料，例如Alexa Fluor™染料、荧光素 (FITC)	兼容
Qdot™纳米晶体	在Click-iT™ Plus检测反应后使用Qdot™纳米晶体

*兼容性是指用于Click-iT™ Plus EdU检测的铜催化时，荧光染料本身或检测方法是否存在不稳定的组分。

固定和破膜

Click-iT™皂苷类破膜洗涤试剂（Click-iT™ saponin-based permeabilization and wash reagent）可用于全血或含有红细胞的细胞悬液，以及含有多种细胞的悬液。这种破膜洗涤试剂在裂解红细胞的同时保持了白细胞的形态学光散射特性。

16. 用3 mL 含1% BSA的PBS洗涤细胞一次, 离心得到细胞团, 弃掉上清液。

17. 加入100 μ L Click-iT™ 固定剂 (Click-iT™ fixative) (组分D), 并充分混匀。

18. 将细胞在室温下避光孵育15分钟。

19. 用3 mL含 1% BSA的PBS洗涤细胞, 离心得到细胞团, 弃掉上清液。如果样本还可见红细胞或血红蛋白残留, 则重复洗涤步骤。确保去除所有残留的红细胞碎片和血红蛋白。

20. 用100 μ L的1X Click-iT™ 皂苷类破膜洗涤试剂 (Click-iT™ saponin-based permeabilization and wash reagent) (在步骤4中制备) 重悬细胞, 并充分混匀。将细胞孵育15分钟或直接进行步骤24。

注

此步骤可以在Click-iT™ EdU检测步骤之前或之后操作。

表面或胞内抗原染色 (可选)

21. 向细胞悬液中加入标记细胞表面抗原或胞内抗原的Qdot™偶联抗体, 充分混匀。

22. 按照抗体染色所需的时间和温度避光孵育。

23. 根据是否已操作Click-iT™ EdU检测步骤从下列表格中选则相应的洗涤细胞步骤:

Click-iT™ EdU检测	操作
已操作Click-iT™ EdU检测步骤	1. 用3 mL的1X Click-iT™透膜洗涤试剂 (1X Click-iT™ permeabilization and wash reagent) 清洗样本。 2. 离心并去上清。 3. 用500 μ L 1X Click-iT™破膜洗涤试剂 (1X Click-iT™ permeabilization and wash reagent) 重悬细胞。 4. 继续进行“细胞染色用于DNA含量测定”(步骤29)或“使用流式细胞仪进行分析”(步骤31)
尚未操作Detect Click-iT™ EdU步骤	1. 用3 mL 含1% BSA的PBS洗涤细胞一次, 离心得到细胞团, 弃掉上清液。 2. 加入100 μ L 1X Click-iT™破膜洗涤试剂 (1X Click-iT™ permeabilization and wash reagent), 并充分混匀。 3. 继续进行“Click-iT™ EdU检测”(步骤24)

细胞增殖检测（续）

Click-iT™反应

24. 用去离子水以1:10的比例稀释10X储备液（在步骤5中制备），制备1X Click-iT™ EdU 缓冲液（Click-iT™ EdU buffer）。

注

在制备后15分钟内使用Click-iT™反应混合物。

25. 根据表2制备Click-iT™反应混合物（Click-iT™ reaction cocktail）。

表2.Click-iT™ Plus EdU反应混合物

反应组分	反应次数						
	1	2	5	10	15	30	50
PBS、D-PBS或TBS	438 µL	875 µL	2.19 mL	4.38 mL	6.57 mL	13.2 mL	21.9 mL
CuSO4（组分F）	10 µL	20 µL	50 µL	100 µL	150 µL	300 µL	500 µL
叠氮化物荧光染料（Fluorescent dye azide）	2.5 µL	5 µL	12.5 µL	25 µL	37.5 µL	75 µL	125 µL
反应缓冲添加剂（在步骤24中制备）	50 µL	100 µL	250 µL	500 µL	750 µL	1.5 mL	2.5 mL
总反应体积	500 µL	1 mL	2.5 mL	5 mL	7.5 mL	15 mL	25 mL

注

每个反应混合物的总体积为600 µL。

26. 在每管中加入0.5 mL Click-iT™ reaction cocktail并充分混匀。

27. 将反应混合物在室温下避光孵育30分钟。

28. 用3 mL的1X Click-iT™皂苷类破膜洗涤试剂（1X Click-iT™ saponin-based permeabilization and wash reagent）在步骤4中制备）洗涤细胞一次，离心弃掉上清液。

如果继续“细胞表面或胞内染色”，用100 µL的1X Click-iT™皂苷类破膜洗涤试剂（重悬细胞）。

如果继续做“DNA含量检测的细胞染色”，请添加500 µL 1X Click-iT破膜洗涤试剂。

DNA含量检测的染色步骤（可选）

29. 如有必要，将核糖核酸酶A（Ribonuclease A）添加到每个样本中并混匀（表3）。

30. 将DNA染料添加到每个样本中，充分混匀，并按照相应的染色条件进行孵育。

表3.Click-iT™ Plus EdU与DNA染料的兼容性

DNA染料	是否需要RNase？	Click-iT™ Plus EdU染色兼容性				
		Alexa Fluor™ 350 吡啶甲基叠氮化物	Alexa Fluor™ 488 吡啶甲基叠氮化物	Alexa Fluor™ 594 吡啶甲基叠氮化物	Alexa Fluor™ 647 吡啶甲基叠氮化物	Pacific Blue™ 吡啶甲基叠氮化物
FxCycle™ Violet	否	是	是	否	是	是
FxCycle™ Far Red	否	否	是	是	是	否
SYTOX™ AADvanced™染料	是	是	是	是	否	是
碘化丙啶 (PI)	是	是	是	是	是	是
Propidium iodide (PI)	是	是	是	否	是	是

用流式细胞仪分析

如果使用仅有鞘液聚焦的传统流式细胞仪检测DNA总量，则请采用低流速采集数据。如果用Attune™声波聚焦流式细胞仪检测，则无论是高流速或低流速，只要进样速度保持在每秒10,000个事件以下，都不会影响信号的准确性。但是，对于同一实验中的每个样本，应尽量使每个样本细胞浓度相通并保持相同的采集速率。DNA染料产生的荧光信号最好通过线性（Linear）放大信号进行检测。Click-iT™ Plus EdU标记产生的荧光信号最好通过对数（Log）放大信号进行检测。

31. 使用流式细胞仪对细胞进行分析。

使用以下各项检测EdU：	使用：
Alexa Fluor™ 350吡啶甲基叠氮化物	使用350 nm激发和440滤光片（450/50 nm或类似通道）
Alexa Fluor™ 488吡啶甲基叠氮化物	使用488 nm激发和绿色滤光片（530/30 nm或类似通道）
Alexa Fluor™ 594吡啶甲基叠氮化物	使用532或561 nm激发和620滤光片（620/15 nm或类似通道）
Alexa Fluor™ 647吡啶甲基叠氮化物	使用633/635 nm激发和红色滤光片（660/20 nm或类似通道）
Pacific Blue™ 吡啶甲基叠氮化物	使用405 nm激发和紫色滤光片（450/40 nm或类似通道）

参考文献

1. Chembiochem 4, 1147 (2003)
2. J Am Chem Soc 125, 3192 (2003)
3. Angew Chem Int Ed Engl 41, 2596 (2002)
4. Angew Chem Int Ed Engl 40, 2004 (2001)
5. BioTechniques 44, 927 (2008)
6. Curr Protoc Cytom 55, 7.38.1 (2011).

T细胞增殖功能检测

细胞增殖代次可视化检测

CellTrace Violet试剂盒用于通过染料稀释来监测不同代的增殖细胞。使用明亮且稳定的染料共价标记活细胞。每一代细胞在流式细胞直方图上显示为不同的、连续同的峰。

注

本方案适用于流式细胞术检测细胞增殖

本方案需要以下材料和试剂

- 10 mL肝素抗凝的外周全血
- CellTrace Violet细胞增殖试剂盒 (CellTrace Violet Cell Proliferation Kit) (货号 C34557)
- OpTmizer T Cell Expansion SFM培养基 (货号A10485-01)
- 青霉素-链霉素-谷氨酰胺 (Penicillin-Streptomycin-Glutamine) (100X) (货号 10378-016)
- PBS (货号10010-023)
- 细胞计数仪, 例如Countess II FL (货号AMQAF1000)
- CD3功能性抗体 (例如Anti-Human CD3 Antibody, Functional Grade, OKT3, 货号 16-0037-81, 或Anti-Mouse CD3e Monoclonal Antibody, 145-2C11, Functional Grade, 货号16-0031-85)。或者, CD28功能性抗体 (例如Anti-Human CD28 Antibody, Functional Grade, CD28.2, 货号16-0289-81, 或Anti-Mouse CD28 Antibody, Functional Grade, 37.51, 货号16-0281-82)

警告

本方案不适用于荧光显微镜或酶标仪

技术提示

- 保留1 mL未染色细胞用于未染色对照样本, 再保留1 mL染色但未受刺激的细胞用于对照组。
- 分析每份样本时采集尽可能多的细胞。
- 使用活性染料, 对活细胞圈门并继续进行流式分析。

实验步骤

配制完全培养基

1. 在1 L OpTmizer T Cell Expansion SFM中, 加入以下试剂:
 - 26 mL T Cell Expansion Supplement (货号 A10485-01)
 - 10 mL青霉素-链霉素-谷氨酰胺

2. 此完全培养基在2–8°C避光条件下可稳定储存4周。

从全血中分离单个核细胞

1. 用10 mL PBS稀释10 mL全血并充分混匀。

2. 将15 mL Ficoll添加到50 mL离心管中, 然后将20 mL稀释的全血轻轻加在上面。

3. 400 x g离心30分钟。

4. 小心吸取淋巴细胞层并转移到新的50mL离心管中。

5. 将细胞重悬于25 mL DPBS缓冲液中。

6. 300 x g离心5分钟, 去上清, 再将细胞并重悬于25 mL DPBS中。

7. 重复洗涤并用10 mL DPBS重悬细胞。

8. 在Countess自动计数仪上或通过其他方法对细胞进行计数; 将细胞浓度调整为 10^6 个细胞/mL。

细胞染色

1. 将20 μ L DMSO加入到CellTrace Violet染色溶液中(制成储备溶液)。

2. 将20 mL的PBS(加热至37°C)加入此储备液制成终浓度为5 μ M染色溶液。

3. 将10 mL的细胞添加到50 mL离心管中。

4. 300 x g离心5分钟, 弃掉上清液。

5. 用10 mL CellTrace Violet染色溶液重悬细胞。

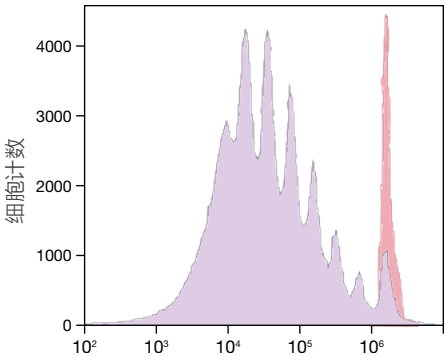
6. 将40 mL OpTmizer T细胞扩增SFM培养基加入细胞以吸收未结合的染料。

T细胞增殖功能检测（续）

- 7. 将细胞孵育5分钟。
- 8. 300 x g离心细胞5分钟, 并用预温的OpTmizer T细胞扩增SFM培养基重悬细胞。

刺激和分析

- 1. 将已染色细胞均匀接种到培养板或培养瓶中中。
- 2. 每1mL细胞使用CD3/CD28功能性抗体或其他刺激物进行刺激（参考T细胞活化, 第24页）。
- 3. 在细胞适当的培养条件下孵育合适的时间。
- 4. 孵育到适当的时间后, 收获细胞并染色其他标记物。
- 5. 在流式细胞仪上通过405 nm激发和450/40带通滤光片通道进行分析。



使用CellTrace Violet试剂对人PBMC进行染色并在培养基中刺激7天。此直方图中分开的几个峰代表连续增殖的几代活细胞。使用具有405 nm 激发和450/40 nm带通滤光片的Attune声波聚焦流式细胞仪完成分析。红色峰表示未刺激的初代细胞。

光谱信息和储存条件

	CellTrace Violet
激发/发射 (nm)	405/450
标准滤光片组	Pacific Blue
储存条件	≤ -20°C



 了解详情, 请登录 thermofisher.cn/flowcytometry



赛默飞
官方微信



赛默飞
生命科学小助手

免费服务电话: 800 820 8982/400 820 8982
信息咨询邮箱: cnbidmarketing@thermofisher.com
www.thermofisher.cn

ThermoFisher
SCIENTIFIC

仅供研究使用。不可用于诊断操作。© 2022 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified. **EXT1711 1221**