

流式染色技术手册

第一部 细胞膜蛋白染色

基于细胞膜蛋白对细胞表型进行鉴定是流式细胞技术最普遍的用途。因为膜蛋白可以直接与抗体作用，而不需要经过透膜的处理。然而实验条件，比如抗体浓度，孵育时间和反应温度等，都需要进行优化。以下为安提海拉生物技术有限公司对于标记细胞膜蛋白的操作手册，请在实验前阅读。

1. 收集细胞：

贴壁细胞需要胰酶消化，悬浮细胞直接收集离心。弃上清，Staining Buffer 清洗 1 次。
染 Staining Buffer 重悬细胞，取 10^6 个细胞/100ul 于流式管中。

2. 染色：

加入适量的流式荧光抗体，比如 PE anti-human CD19 Ab (Biolegend, Cat#: 392507)，
5ul/ 10^6 个细胞。避光，4℃，30min。

3. 清洗：

300g 离心 5min，弃上清，用 Staining Buffer 重悬清洗，重复 2 次。

4. 如果使用荧光标记二抗，重复 2-3 步骤。

5. 上机：500ul Staining Buffer 重悬细胞，上机。

第二部 细胞内蛋白染色

流式细胞技术可以用于分析不同的细胞内蛋白，包括磷酸化信号通路蛋白和细胞因子。对于标记胞内蛋白，细胞需要先固定和透膜后再加入标记抗体。通常采用去污剂如皂素、Triton[®] X-100 或 Tween[®] 20. 固定透膜剂亦可以购买商品化试剂。

1. 收集细胞：

贴壁细胞需要胰酶消化，悬浮细胞直接收集离心。弃上清，Staining Buffer 清洗 1 次。Staining Buffer 重悬细胞，取 10^6 个细胞/100ul 于流式管中。离心去掉缓冲液。

2. 固定：

加入 500ul 预冷的 Fixation Buffer，重悬细胞。室温固定 10-20min。重悬细胞时要迅速，使得细胞成为单个细胞。

3. 清洗：

300g 离心 5min，弃固定液，PBS 清洗 2 次。

4. 透膜：

200ul Permeabilization/Wash Buffer 重悬细胞。透膜 10min。

5. 染色：

加入适量的流式荧光抗体，比如 PE anti-human CD19 Ab (Biolegend, Cat#: 392507)，5ul/ 10^6 个细胞。避光，4°C，30min。

6. 清洗：

300g 离心 5min，弃上清，用 Staining Buffer 重悬细胞清洗，重复 2 次。

7. 如果使用荧光标记二抗，重复 5-6 步骤。

8. 上机：500ul Staining Buffer 重悬细胞，上机。