

细胞表面抗原染色——间接标记

A. 所需溶液和试剂

1. 磷酸盐缓冲液 (C01-01002): 0.1M PH7.4 1X PBS
2. 固定液: 4%多聚甲醛溶液 (无甲醇) (C01-06001); 1%多聚甲醛溶液 (无甲醇) (C03-02001)
3. 穿膜剂(C01-03001): 0.3% tritonX-100
4. 抗体封闭液 (C03-03001): 10%山羊血清溶液
5. 孵育缓冲液(C03-03002): 2% BSA 的 0.1M PBS
6. 抗体稀释液(C01-04001): 1% BSA, 0.03% Proclin300 的 0.1M PBS

B. 样本处理——固定

1. 离心收集细胞, 弃上清。
2. 将细胞重悬在 1 ml PBS(C01-01002)中。加入等体积甲醛溶液(C01-06001)至终浓度为 2%, 37° C 固定 10 分钟。(或者用 70%的冰乙醇 5-10ML, 4°C固定 16 小时)
3. 放在冰上降温 1 分钟后加入 1 X PBS , 800rpm 离心 5min 去上清, 重复一次。

C. 抗体标记

1. 将 0.5-1 x 10⁶ 个细胞分到各检测管中。
2. 各管加入 2 ml PBS(C01-01002), 200g 离心 5 分钟, 回收细胞。重复一次。
3. 向每支检测管中加入 100 μl 孵育缓冲液 (C03-03002)重悬细胞。
4. 向每支样品管中加入经抗体稀释液(C01-04001)按合适比例稀释后的无荧光一抗, 室温孵育 30 分钟。
5. 加入 2 ml 孵育缓冲液, 200g 离心 5 分钟, 离心回收细胞; 重复一次。
6. 向每只检测管中加入 100 μl 孵育缓冲液 (C03-03002)重悬细胞后加入 100 μl 10%山羊血清的孵育缓冲液中 (C03-03001), 室温, 封闭 15 分钟。
7. 加入一定比例稀释的荧光素二抗, 室温孵育 40 分钟。
8. 重复步骤 5。
9. 将细胞重悬在 1%多聚甲醛溶液 (C03-02001) 中然后用流式细胞仪检测。

注意: 1) 甲醛溶液加入量为 1X10⁶cells / mL。

2) 冰乙醇与冰甲醇的加入方法: 向细胞中逐滴加入冰乙醇; 向细胞中缓慢加入冰甲醇。

3) 同型对照的设置。

4) 标记前细胞计数。