

流式细胞术 (FCM)

溶液和试剂配制

1. PBS缓冲液: 使用PBS粉末和 ddH₂O 配成, 使用前置于4°C冷却。
2. 固定液 (选用): 4%多聚甲醛
3. 破膜剂 (选用): 0.1% TritonX-100, 用TritonX-100和PBS缓冲液配制, 4°C存储。
4. 封闭液: 5% BSA, 用BSA和PBS缓冲液配制, 现配现用, 4°C存放。

实验操作流程

A. 样本制备

1. 细胞收集
 - (1) 悬浮细胞: 直接离心细胞培养基, 收集细胞。
 - (2) 贴壁细胞: 弃培养基, PBS洗涤1次, 加入胰酶消化细胞, 收集细胞。
 - (3) 组织样本: 剪碎组织后用胶原酶/胰酶消化, 过筛网去除组织块, 收集细胞。
2. 细胞计数与悬液制备
 - (1) 加入1 mL PBS重悬, 1500 rpm离心5 min, 弃上清, 重复洗涤1-2次。
 - (2) 取少量细胞悬液, 台盼蓝染色并对活细胞计数, 调整细胞浓度至 1×10^6 - 5×10^6 cells/mL。

B. 细胞表面抗原染色 (无需破膜)

1. 封闭: 取 1×10^6 cells, 加入300 μ L封闭液重悬细胞, 室温避光孵育15 min。1500 rpm离心5 min, 弃上清, 用PBS缓冲液洗1次。
2. 抗体孵育: 加入适量荧光标记抗体, 轻弹混匀, 4°C避光孵育20-30 min (抗体稀释度可参考产品网站)。
3. 洗涤: 加1 mL PBS, 1500 rpm离心5 min, 弃上清, 重复1次
4. 重悬: 加入500 μ L PBS缓冲液重悬细胞, 用35-40 μ m滤网过滤, 去除聚集细胞团, 细胞转移至流式管。

C. 细胞内抗原染色 (需破膜)

1. 固定细胞: 取 1×10^6 cells, 加入1 mL 4%多聚甲醛, 室温避光固定15-20 min。1500 rpm离心5 min, 弃上清, 用PBS缓冲液洗涤2次。
2. 破膜: 加入500 μ L 0.1% TritonX-100, 涡旋混匀, 冰上避光孵育10-20 min。1500 rpm离心5 min, 弃上清, 用含0.1% TritonX-100的PBS缓冲液洗1次。
3. 封闭: 加入300 μ L封闭液重悬细胞, 室温避光孵育20 min。1500 rpm离心5 min, 弃上清, 用含0.1% TritonX-100的PBS缓冲液洗1次。
4. 抗体孵育: 加入适量荧光标记抗体, 轻弹混匀, 4°C避光孵育30-60 min (抗体稀释度可参考产品网站)。



5. 洗涤:加入1 mL含0.1% TritonX-100的PBS缓冲液重悬细胞,1500 rpm离心5 min,弃上清。用含0.1% TritonX-100的PBS缓冲液重复洗涤1次。再用PBS缓冲液洗涤1次。

6. 重悬:加入500 μ L PBS缓冲液重悬细胞,用35-40 μ m滤网过滤,去除聚集细胞团,细胞转移至流式管。

D. 上机检测

设置流式细胞仪检测参数,并上机检测。

实验注意事项

1. 使用荧光标记抗体时,不需要使用二抗。但若使用的抗体为非荧光标记抗体,则需要使用荧光标记二抗(能够识别一抗种属)。
2. 细胞破膜可选用0.1% TritonX-100或90%甲醇,TritonX-100适用于大多数胞内抗原,甲醇破膜更彻底但可能破坏部分抗原构象(需进行预实验以优化条件)。

实验相关产品推荐

1. 流式专用荧光标记抗体: https://www.targetmol.cn/antibodies/flow_cytometry_antibodies
2. 牛血清白蛋白 (BSA), T5664
3. TritonX-100, T64297

