

# 流式细胞术胞内染色方案

## 一、耗材与试剂

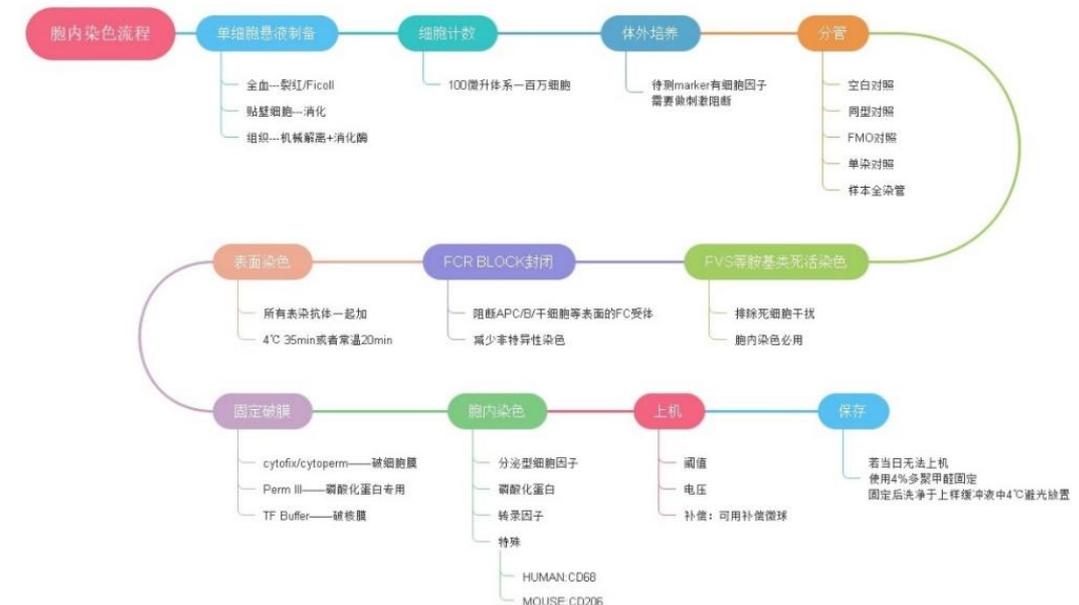
表 1 胞内染色耗材试剂参考表

材料	试剂	设备
70 μm 筛网	补偿微球	细胞计数板
10 ml 移液管	刺激剂	电动移液器、1 mL 枪头
5 mL 流式管	阻断剂	高速离心机
	Fc 受体阻断剂	涡旋仪
	死活染料（胺基类染料）	4°C冰箱
	细胞染色缓冲液	流式细胞仪
	4%多聚甲醛（通用型组织固定液）	
	破膜剂	
	流式抗体	

表 2 热卖产品推荐

用途	产品名称	货号	厂家	规格
Fc 受体阻断	Mouse FcR Blocking Reagent	S0B0599	STARTER	50μg/200μg/500μg/1mg
	Human FcR Blocking Reagent	S0F0002	STARTER	50μg/100μg/200μg
	Human FcR Blocking Reagent	S0F0008	STARTER	50μg/100μg/200μg

## 二、实验流程图



### 三、实验步骤

#### (1) 实验分组

类别	数量	设置	必要性
空白管	1 管	不加任何抗体	必做
单阳管	与流式仪占用通道数量一致	只加一种抗体，细胞数量不够可用补偿微球替代调补偿	必做
同型对照管	1 管	只加同型抗体	必做
FMO 管	根据实验安排	其他通道荧光抗体都加，只有 1 个通道荧光抗体不加	建议表达量低的指标设置
样本管	根据实验安排	所以荧光抗体都加	必做

#### (2) 操作步骤

1. 将样本制备成单细胞悬液，操作步骤见“单细胞悬液样本制备”。
2. 进行细胞计数，并调整细胞浓度至  $1\sim 3\times 10^6$  个/mL。
3. 将 1 mL 细胞接种到 6 孔板或者 500  $\mu$ L 的细胞接种到 12 孔板。
4. 每 1 mL 细胞加入 1  $\mu$ L PMA (50 ng/mL) 和 1  $\mu$ L Ionomycin (1  $\mu$ g/mL)，37  $^{\circ}$ C，5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 4-6 h。
5. 刺激 2-4 h 后，加入 Brefeldin A 或者 Monensin 进行阻断。

▲注意：不同指标根据文献和实际情况进行浓度摸索。

一般情况下，静息状态的 T、B 细胞不产生或产生极低细胞因子，多数细胞因子必须在细胞活化后才能分泌，因此需要体外激活来刺激细胞因子的表达。这里刺激剂的目的只是激活静息状态的 T 细胞，从而表达相应细胞因子，并不会导致 T 细胞亚型比例变化。不同因子的最适刺激条件有所不同，建议使用最佳刺激方案来对细胞进行刺激。

**常见刺激剂的选择：PMA、离子霉素**

**PMA：**T 细胞的活化通常是由细胞表面受体与其配体结合后触发的。受体与配体结合后，可通过磷脂酶 C 使磷脂酰肌醇水解成甘油二酯和肌醇磷酸盐，而甘油二酯是蛋白激酶 C (PKC) 的异构性活化因子，肌醇磷酸盐则可启动钙离子动员和释放，从而触发一系列与 T 细胞活化相关的细胞反应。PMA 其结构上类似于甘油二酯，所以同样可以活化蛋白激酶 C。

**离子霉素：**作为一种钙离子载体，可将细胞器内的 Ca<sup>2+</sup>转运到胞浆，提高胞浆内游离 Ca<sup>2+</sup>的水平，因此 PMA 和 Ionomycin 的共同作用可以激活 PKC，从而引起一系列的下流反应。

**常见阻断剂的选择：BFA、Momensin**

**BFA：**蛋白质在合成之后，需要到内质网上折叠加工，完成后转运到高尔基体进一步修饰加工，再形成囊泡转运到胞外，BFA 是一种真菌代谢物，可以抑制内质网 (ER) 和高尔基体之间的蛋白质转运。

**Monensin (莫能霉素)**：是另一种阻断剂，作为离子载体可选择性结合单价阳离子并把这些阳离子转运到细胞膜内，破坏跨膜离子梯度，阻断蛋白从高尔基体转运到胞外。

6. 收集细胞，300×g 离心 5 min 弃上清。

7. 每管流式管中加入 1 mL 不含蛋白的 1×DPBS 重悬沉淀，涡旋混匀，300×g 离心 5 min。

8. 弃上清液，1 mL DPBS 重悬细胞沉淀，加入合适体积 Fixable Viability Stain 系列死活染料并立即涡旋混匀，室温避光孵育 10-15 min (4°C 30~40 min)。

▲ **注意**：FVS 染料是一种胺反应活性非跨膜型细胞死活染料，可通过对细胞的染色强弱区分细胞膜通透性，从而判定细胞死活，为防止游离蛋白中和 FVS 染料，要在染色前通过不含任何蛋白的 1×DPBS 离心清洗去除样本中的游离蛋白。同样，染色结束必须使用含有蛋白的液体终止 FVS 染色。

9. 加入 2 mL 细胞染色缓冲液，300×g 离心 5 min，弃上清。

10. 100 μL 细胞染色缓冲液重悬细胞沉淀并混合均匀，加入 1 μg Mouse (**S0B0599**) / 2-4 μg Human (**S0F0002**)的 Fc Block 抗体，冰上预孵育细胞 20~30 min，从而阻断 Fc 受体。

▲ **注意**：Fc 阻断剂 (Fc Block) 的作用是阻断巨噬、B 细胞等细胞表面存在的可与单克隆荧光抗体 Fc 片段结合的受体，减少非特异性染色。

11. 每管中加入 1 mL 细胞染色缓冲液，300×g 离心 5 min。

12. 弃上清，100 μL 细胞染色缓冲液重悬细胞沉淀并混合均匀，加入合适浓度的表面抗体 (例如 CD3/CD4/CD8/CD19/CD56 等)，冰上避光孵育 30 min。

▲ **注意**：我们建议滴定抗体以获得最佳染色性能，因为不同的细胞类型和不同的应用会导致染色的广泛差异。

13. 加入 1 mL 细胞染色缓冲液，300×g 离心 5 min 洗涤 1 次。

14. 重复步骤 (13) 一次，收集细胞沉淀。

15. 每管加入 500 μL 4°C 预冷的 4% 多聚甲醛，室温避光孵育 10 min。

16. 450×g 离心 5 min。弃上清，加入 2 mL 细胞染色缓冲液，4°C 450×g 离心 5 min。

17. 弃上清，加入适量破膜剂，4°C 避光孵育，破膜后，4°C 450×g 离心 5 min。

18. 弃上清，加入 100 μL 细胞染色缓冲液重悬，加入合适浓度胞内抗体 (例如 IFN-γ/CD206/CD68 等)，涡旋混匀，4°C 避光孵育 45-50 min。

19. 弃上清，加入 1 mL 细胞染色缓冲液，4°C 450×g 离心 5 min 清洗 2 次。

20. 弃上清，300 μL 细胞染色缓冲液重悬，70 μm 细胞筛网过滤上机。