

流式分析染色步骤（中文原版）

膜染色

1. 细胞制备：

收集待检测细胞样本，计数并测活率，然后用 1mL 0.5% BSA/PBS 溶液重悬洗涤 2 次，400 g 离心 3 min 弃上清；

2. 细胞封闭：

若细胞样本 FC 受体较多，需使用 FC 受体封闭液重悬细胞，孵育 1 h 后，离心弃上清；

3. 一抗孵育：

用 0.5% BSA/PBS 溶液重悬细胞，均分到 96 孔板中，50 μ L/孔（每孔细胞量 $5E5\sim 1E6$ ），然后加入一抗稀释液（0.5% BSA/PBS 溶液稀释），50 μ L/孔，混匀；将 96 孔板至于振荡仪上，室温孵育 20 min；

4. 一抗洗涤：

孵育结束后，400 g 离心 5 min 弃上清，每孔用 200 μ L 0.5% BSA/PBS 重悬洗涤，400 g 离心 5 min 弃上清；

5. 二抗孵育：

若一抗未标记荧光，则需加入相应种属的荧光二抗稀释液，100 μ L/孔，避光振荡，室温孵育 20 min；

若一抗已标记荧光，则重复步骤 4 后跳转到步骤 7；

6. 二抗洗涤：

孵育结束后，400 g 离心 5 min 弃上清，每孔用 200 μ L 0.5% BSA/PBS 重悬洗涤 2 次，400 g 离心 5 min 弃上清；

7. 7-AAD 染色重悬上机：

使用 100-200 μ L 含有 7-AAD 死活染料的稀释液重悬细胞，上机分析。

胞内染色

1. 细胞制备:

收集待检测细胞样本, 计数并测活率, 然后用 1mL 0.5% BSA/PBS 溶液重悬洗涤 2 次, 400 g 离心 3 min 弃上清;

2. 死活染色:

使用 Zombie 染料稀释液, 室温避光染色 15 min, 离心弃上清, 使用 1mL 0.5%BSA/PBS 洗涤 2 次;

3. 细胞固定:

使用 4%多聚甲醛固定液重悬细胞, 旋转孵育固定 15 min, 再使用 0.5% BSA 洗涤 1 次;

4. 细胞破膜和封闭:

甲醛/Triton 法: 使用 Triton X-100 破膜液重悬细胞, 旋转孵育破膜 15 min, 离心弃上清, 再使用 FC 受体封闭液重悬, 孵育 1 h 后, 离心弃上清;

甲醛/皂素法: 使用含有 0.1%皂素的 0.5% BSA/PBS 配制封闭液, 使用该封闭液重悬细胞, 孵育 1 h 后, 离心弃上清; (该步骤后所有缓冲液应均含有 0.1%皂素, 因为皂素破膜是可逆的)

*后续实验中, 甲醛/Triton 法缓冲液为 0.5%BSA/PBS, 甲醛/皂素法缓冲液为含有 0.1%皂素的 0.5% BSA/PBS

5. 一抗孵育:

用缓冲液重悬细胞, 均分到 96 孔板中, 50 μ L/孔 (每孔细胞量 $5E5\sim 1E6$), 然后加入一抗稀释液 (缓冲液稀释), 50 μ L/孔, 混匀; 将 96 孔板至于振荡仪上, 室温避光孵育 30 min;

6. 一抗洗涤:

孵育结束后, 400 g 离心 5 min 弃上清, 每孔用 200 μ L 缓冲液重悬洗涤, 400 g 离心 5 min 弃上清;

7. 二抗孵育:

若一抗未标记荧光，则需加入相应种属的荧光二抗稀释液（缓冲液稀释），100 μ L/孔，避光振荡，室温

孵育 30 min；

若一抗已标记荧光，则重复步骤 6 后跳转到步骤 9；

8. 二抗洗涤：

孵育结束后，400 g 离心 5 min 弃上清，每孔用 200 μ L 缓冲液重悬洗涤 2 次，400 g 离心 5 min 弃上清；

9. 重悬上机：

使用 100-200 μ L 缓冲液重悬细胞，上机分析。