

细胞内（细胞质）蛋白质

一般注意事项

为了获得荧光抗体的最佳性能，请将抗体 4°C 避光保存。切勿冷冻。

使用前，快速离心抗体以恢复最大体积。不建议涡旋抗体。

除非操作步骤中注明，否则所有染色操作应在冰上或在 4°C 下进行并尽可能避光。

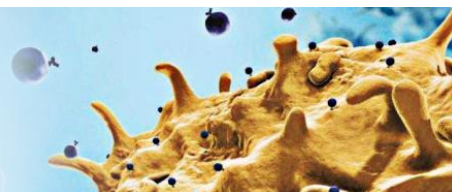
细胞内抗原检测所需的固定和破膜步骤可改变细胞的光散射性质，并可能增加非特异性背景染色。在染色液中加入额外的蛋白质，如 BSA 或胎牛血清（FCS），可能有助于减少非特异性背景。建议使用[可固定细胞活性染料（FVD）](#)来帮助消除分析过程中的死细胞。

以下操作步骤允许在单细胞水平同时分析细胞表面分子和细胞内抗原。在该操作步骤中，固定步骤之后是破膜，在细胞膜上穿孔，这需要在所有后续步骤中持续存在破膜液。这使得抗体可以进入细胞的胞质。因此，所有细胞内染色必须在存在破膜液的条件下进行。

该操作步骤推荐用于体外或体内活化后个体细胞中的胞浆蛋白、细胞因子或其他分泌蛋白的检测。对于细胞因子检测来说，细胞因子产生的适当刺激条件和动力学会根据细胞类型和待测定的特定细胞因子而变化。例如，为了刺激 T 细胞产生 IFN- γ 、TNF- α 、IL-2 和 IL-4，可以使用 PMA（佛波醇酯，蛋白激酶 C 激活剂）和离子霉素（钙离子载体）的组合或抗-CD3 抗体。为了诱导单核细胞产生 IL-6、IL-10 或 TNF- α ，可以使用脂多糖（LPS）刺激。对于细胞的体外刺激，在刺激操作步骤的最后几小时期间，必须用蛋白质转运抑制剂（例如莫能菌素或布雷菲德菌素 A 溶液）阻断细胞因子的分泌。建议研究人员评估不同蛋白质转运抑制剂在其特定检测系统中的用途和功效。

材料

- 12x75 mm 圆底试管
- [可选] Invitrogen™ 产品线，如可固定活性染料 [eFluor™ 455UV](#) (# 65-0868)、[eFluor™ 450](#) (# [65-0863](#))、[eFluor™ 506](#) (# [65-0866](#))、[eFluor™ 660](#) (# [65-0864](#)) 或 [oeFluor™ 780](#) (# [65-0865](#))
- 荧光偶联抗体



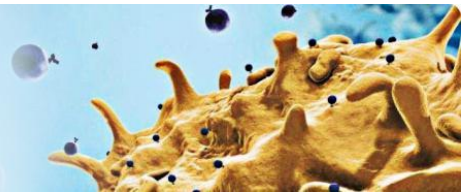
- 细胞内固定和破膜缓冲液组合 (# [88-8824](#))
- 流式细胞分析染色液 (# 222026)
- 细胞刺激混合剂 (加上蛋白质转运抑制剂) (500X) (# [00-4975](#)) 或蛋白质运输抑制剂混合剂 (500X) (# [00-4980](#)) 或布雷菲德菌素 A 溶液 (# [00-4506](#)) 或莫能菌素溶液 (# [00-4505](#))

缓冲液和溶液制备

将 1 份 10X 浓缩液与 9 份蒸馏水混合, 制备 1X 破膜液工作液。 每个样品需要 8.5 mL 1X 的破膜液。

12 x 75 mm 管的实验步骤

- 1.制备单细胞悬液。
- 2.[可选]使用可固定化细胞活性染料对细胞进行染色。 有关详细信息, 请参阅[活性染料染色](#)。
- 3.对细胞表面标记进行染色。 有关详细信息, 请参阅[细胞表面靶标染色](#)。
- 4.最后一次洗涤后, 弃上清并脉冲涡旋样品以完全解离细胞团块。 通常保留约 100 μ L 残余体积。
- 5.添加 100 μ L IC 固定液来固定细胞, 之后涡旋混合。
- 6.在室温下孵育 20-60 分钟。 避光。
- 7.加入 2 mL 1X 透化液, 在室温下 400-600 x g 离心 5 分钟。 弃上清。
- 8.重复第 7 步。
- 9.将细胞沉淀重悬于 100 μ L 1X 透化液中。 加入推荐量的直接偶联的一抗以检测细胞内抗原, 并在室温下孵育 20-60 分钟。 避光。
- 10.加入 2 mL 1X 破膜液, 在室温下 400-600 x g 离心 5 分钟。 弃上清。
- 11.重复第 10 步。
- 12.将染色细胞重悬于适当体积的流式细胞术染色液中。



13.通过流式细胞术分析样品。

96 孔板实验步骤

- 1.制备单细胞悬液。
- 2.[可选]使用可固定化细胞活性染料对细胞进行染色。 有关详细信息, 请参阅活性染料染色, 操作步骤 C 最佳操作步骤。
- 3.对细胞表面标记进行染色。 有关详细信息, 请参阅细胞表面靶标染色, 操作步骤 A 最佳操作步骤。
- 4.最后一次洗涤后, 弃上清并脉冲涡旋样品以完全解离细胞团块。 通常保留约 100 μL 残余体积。
- 5.每孔添加 200 μL IC 固定液来固定细胞。 最好使细胞完全重悬于添加的溶液中。 可选择移液。
- 6.在室温下孵育 20-60 分钟。 避光。
- 7.室温下 400-600 x g 离心样品 5 分钟。 弃上清。
- 8.每孔中加入 200 μL 1X 破膜液, 室温下 400-600 x g 离心样品 5 分钟。 弃上清。
- 9.在剩余体积中重悬沉淀, 用 1X 透化液将体积调节至约 100 μL 。
- 10.[可选]直接向细胞中加入 2 μL 2%正常小鼠/大鼠血清封闭。 室温孵育 15 分钟。
- 11.不洗涤, 加入推荐量的直接偶联抗体以检测细胞内抗原, 并在室温下孵育 30 分钟以上。 避光。
- 12.每孔中加入 200 μL 1X 破膜液, 室温下 400-600 x g 离心样品 5 分钟。 弃上清。
- 13.重复第 13 步。
- 14.将染色细胞重悬于适当体积的流式细胞术染色液中。
- 15.通过流式细胞术分析。