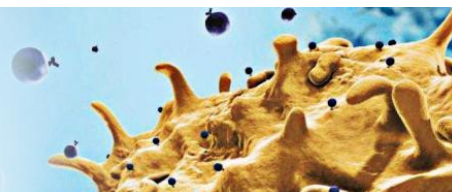




Precision BioMedicals Co., Ltd.

金准生物医药科技(天津)有限公司



操作步骤 A： 两步法：细胞内（细胞质）蛋白质

操作步骤 B： 一步法：细胞内（核）蛋白质

操作步骤 C： 固定/甲醇的两步法（磷酸化信号蛋白的固定染色方案）

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。

操作步骤 A： 两步法：细胞内（细胞质）蛋白质

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。

对于核蛋白如转录因子的检测，请参见下面的**操作步骤 B： 一步法：细胞内（核）蛋白**。对于一些磷酸化的信号分子如 MAPK 和 STAT 蛋白的检测，可能优选使用下面的**操作步骤 C： 两步法： 固定/甲醇**。

材料

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

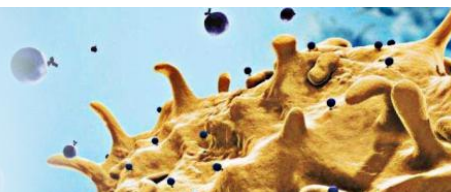
仅供研究使用，不可用于治疗或诊断。

-1-



Precision BioMedicals Co., Ltd.

金准生物医药科技(天津)有限公司



- 细胞内固定和破膜缓冲液组合 (货号 [88-8824](#))
- 流式细胞分析染色液 (货号 222026)
- 细胞刺激混合剂 (加上蛋白质转运抑制剂) (500X) (货号 [00-4975](#)) 或蛋白质运输抑制剂混合剂 (500X) (货号 [00-4980](#)) 或布雷菲德菌素 A 溶液 (货号 [00-4506](#)) 或莫能菌素溶液 (货号 [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 μ L 残余体积。
5. 每孔添加 200 μ L 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。

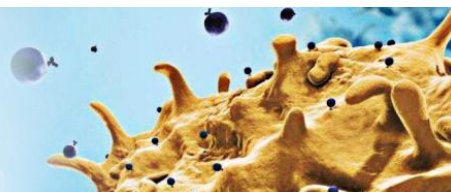
仅供研究使用, 不可用于治疗或诊断。

-2-



Precision BioMedicals Co., Ltd.

金准生物医药科技(天津)有限公司



8. 每孔中加入 200 μ L 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 μ L。
10. [可选] 直接向细胞中加入 2 μ L 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 μ L 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。

操作步骤 B: 一步法: 细胞内(核)蛋白质

以下操作步骤可以在单细胞水平同时分析细胞表面分子和细胞内抗原, 包括核抗原。 该操作步骤将固定和破膜结合到一个步骤中。 推荐用于检测核抗原如转录因子, 但也可用于检测许多细胞因子。 有关 Foxp3 /转录因子染色液组合(货号 [00-5523-00](#)) 与细胞因子抗体的兼容性, 请参阅抗体固定注意事项以得到更好的抗体克隆性能。

材料

- 12 x 75 mm 圆底试管或 96 孔 V 型或 U 型底微量滴定板
- [可选] 可固定细胞活性染料 (FVD) eFluor 455UV、450、506、520、660 和 780 (货号分别为 [65-0868](#)、[65-0863](#)、[65-0866](#)、[65-0867](#)、[65-0864](#)、[65-0865](#))
- [可选] 正常小鼠血清
- [可选] 正常大鼠血清
- 荧光偶联抗体
- Foxp3 /转录因子固定破膜染色液组合 (货号 [00-5523](#))
- 流式细胞分析染色液 (货号 [222026](#))

缓冲液和溶液制备

- 将 1 份 4x Foxp3 固定/破膜浓缩液 (#00-5123) 与 3 份 Foxp3 固定/破膜稀释剂 (#00-5223) 混合, 制备新鲜的 Foxp3 固定/破膜工作液。 如果在管中染色, 则每个样品需要 1 mL 工作液。
- 将 1 份 10x 破膜透化液 (#00-8333) 与 9 份蒸馏水混合, 制备 1x 破膜液工作液。 如果在管中染色, 则每个样品需要 8.5 mL 工作液。

12 x 75 mm 管的实验步骤

1. 制备单细胞悬液。 请参阅流式细胞细胞制备最佳操作步骤。

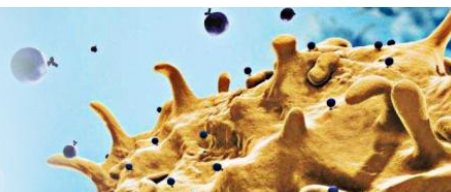
仅供研究使用, 不可用于治疗或诊断。

-3-



Precision BioMedicals Co., Ltd.

金准生物医药科技(天津)有限公司



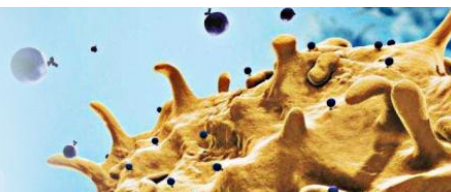
- 2.[可选]使用可固定细胞活力染料对细胞进行染色。 更多详情请见“[活力染料染色](#)”
- 3.对细胞表面标记进行染色。 有关详细信息, [请参阅细胞表面靶标染色, 操作步骤 A](#)。
- 4.最后一次细胞悬液洗涤后, 弃上清并脉冲涡旋样品以完全解离沉淀。 通常保留约 100 μL 残余体积。
- 5.向每个管中加入 1 mL Fc γ 3 固定/破膜工作溶液并脉冲涡旋
- 6.2-8°C 或室温孵育 30-60 分钟。 避光。(小鼠样品可在 2-8°C 避光孵育长达 18 小时)。
- 7.每管加入 2 mL 1 $\times$ 破膜工作液, 在室温下 400-600 $\times$ g 离心样品 5 分钟。 弃上清。
- 8.[可选]重复第 7 步。
- 9.在剩余体积的 1 $\times$ 破膜液中重悬沉淀。 通常为 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。 在室温下孵育 15 分钟。
- 11.不洗涤, 加入推荐量的荧光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.每管加入 2 mL 1 $\times$ 破膜液, 在室温下 400-600 $\times$ g 离心样品 5 分钟。 弃上清。
- 13.重复第 12 步。
- 14.将染色细胞重悬于适当体积的流式细胞染色液中。
- 15.通过流式细胞仪分析样品。

96 孔板实验步骤

- 1.制备单细胞悬液。 请参阅流式细胞细胞制备最佳操作步骤。
- 2.[可选]使用可固定细胞活性染料对细胞进行染色。 更多详情请见“活力染料染色, 操作步骤 C”
- 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。
- 4.最后一次洗涤后, 弃上清并脉冲涡旋样品以完全离解沉淀。
- 5.每孔加入 200 μL Fc γ 3 固定/破膜工作溶液。 最好使细胞完全重悬于添加的溶液中。 可选择移液。
- 6.2-8°C 或室温孵育 30-60 分钟。 避光。(小鼠样品可在 2-8°C 避光孵育长达 18 小时)。
- 7.在室温下 400-600 $\times$ g 离心样品 5 分钟。 弃上清。
- 8.每孔加入 200 μL 1 $\times$ 破膜液, 在室温下 400-600 $\times$ g 离心样品 5 分钟。 弃上清。
- 9.重复第 8 步。
- 10.在剩余体积中重悬沉淀, 用 1 $\times$ 破膜液将体积调节至约 100 μL 。
- 11.[可选]直接向细胞中加入 2 μL 2% 正常小鼠/大鼠血清封闭。 在室温下孵育 15 分钟。
- 12.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。
- 13.每孔加入 200 μL 1 $\times$ 破膜液, 在室温下 400-600 $\times$ g 离心样品 5 分钟。 弃上清。
- 14.重复第 13 步。
- 15.将染色细胞重悬于适当体积的流式细胞染色液中。

仅供研究使用, 不可用于治疗或诊断。

-4-



16. 通过流式细胞仪分析。

操作步骤 C： 固定/甲醇的两步法

以下操作步骤允许同时分析细胞表面分子和一些细胞内磷酸化信号蛋白。 在该操作步骤中，固定之后用甲醇处理细胞。 对于磷酸化蛋白质检测，合适的磷酸化刺激条件和动力学将根据细胞类型和所测定的特定信号传导事件而变化。 例如，为了诱导磷酸化-STAT1 (Y701) 的磷酸化，可以用 IFN γ 激活巨噬细胞，而在 T 细胞中诱导磷酸化-ERK1 / 2 (T202 / Y204) 则响应于 PMA (佛波酯和蛋白激酶 C 激活剂) 或抗 CD3 交联。

一般注意事项

1. 荧光偶联的抗体可用于染色表面蛋白质，用于免疫表型分析细胞，进一步分析磷酸化蛋白质；但是，有必要考虑染色的其他考虑因素。

活细胞上表面标志物的抗体染色可能改变信号蛋白的表达，因为可能刺激/抑制信号传导事件。 因此，在细胞刺激之前不建议进行表面染色。 相反，表面蛋白染色可与细胞内蛋白质染色相同的步骤。 请注意，除了表面定位之外，一些蛋白质也将具有细胞内的库，这些应该考虑。 识别固定细胞/抗原决定簇的表面蛋白的抗体克隆需要评估和使用。 有关抗体克隆性能，请参阅抗体固定注意事项。

如果在固定前需要表面染色（由于固定引起的抗原决定基破坏），只有当偶联的荧光染料对甲醇暴露有抗性时，才能在固定/甲醇步骤之前用荧光染料偶联的抗体染色细胞（参见下表）。

耐甲醇荧光染料	甲醇敏感荧光染料
Alexa Fluor 488	PE
eFluor 660	PE-tandems
Alexa Fluor 647	PerCP
eFluor 450	PerCP-tandems
FITC	APC
	APC-tandems

2. 对于贴壁细胞，我们建议将细胞固定在平板/孔中。 固定后，刮下细胞或用 EDTA 溶液处理进行收获并继续操作步骤。 如果不需要表面染色或表面染色蛋白对胰蛋白酶消化具有抗性，可以使用胰蛋白酶。

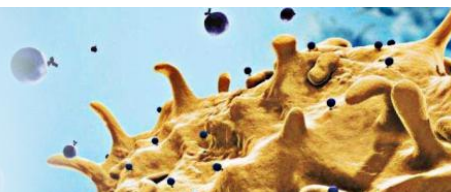
材料

- 12 x 75 mm 圆底试管或 96 孔 V 型或 U 型底微量滴定板
- 自选组织培养基



Precision BioMedicals Co., Ltd.

金准生物医药科技(天津)有限公司



- 自选细胞刺激剂
- 一抗（荧光直标）
- 流式细胞分析染色液（货号 [222026](#)）
- IC 固定液（货号 [00-8222](#)）
- 90-100%甲醇（HPLC 级）
- [可选]Fc 封闭： 纯化的抗小鼠 CD16/CD32（货号 [14-0161](#)）或纯化的人 FC 受体结合抑制剂

实验步骤

- 1.在合适的培养基中制备用于刺激的目标细胞。
- 2.细胞计数，以 $1-5 \times 10^6$ 个细胞/ mL 在合适的培养基中重悬。
- 3.37°C 下，在需要的时间点用适当的处理来刺激细胞。 记住在 37°C 孵育未处理的细胞作为阴性对照。
- 4.[可选]如果在固定之前需要表面染色（在步骤 5 中），则使用与抗甲醇荧光染料偶联的抗体，如“流式细胞细胞表面靶标染色操作步骤”中所述来染色细胞表面抗原
- 5.在刺激期结束时，通过将等体积的 IC 固定液直接添加到细胞中并涡旋混合来固定细胞以停止刺激。
- 6.在室温下孵育样品 10-60 分钟。 避光。
- 7.在室温下 400-600 x g 离心样品 5 分钟。 弃上清。
- 8.将细胞沉淀重悬于剩余体积中，加入 1 mL 预冷的 90-100%甲醇。 涡旋混合并在 2-8°C 下孵育至少 30 分钟。
注意： 一旦加入甲醇，细胞可以在 $<-20^{\circ}\text{C}$ 下储存长达 4 周。
- 9.用过量体积的流式细胞染色液洗涤细胞
- 10.在室温下 400-600 x g 离心细胞 5 分钟。 弃上清。
- 11.用流式细胞染色液以 1×10^7 个细胞/ mL 重悬细胞，并将 1×10^6 个细胞（100 μL ）等分到单独的流式管中。
- 12.[可选] 在染色前，使用纯化的抗小鼠 CD16 / CD32 或人 Fc 受体结合抑制剂封闭，可以阻断细胞的非特异性 Fc 介导的结合。
- 13.每管加入推荐量的直接偶联抗体，并在室温下孵育 30-60 分钟。 避光。
注意： 如果需要，可以同时进行表面染色和细胞内磷酸染色。 由于并非所有抗体克隆都与固定的抗原决定簇结合，因此请参阅“固定/破膜后抗体克隆性能”表。
- 14.加入 2 mL 流式细胞术染色液，在室温下 400-6—x g 离心 4-5 分钟。 弃上清。
- 15.重复第 14 步。
- 16.将染色细胞重悬于适当体积的流式细胞术染色液中。
- 17.通过流式细胞术分析样品。

96 孔板实验步骤

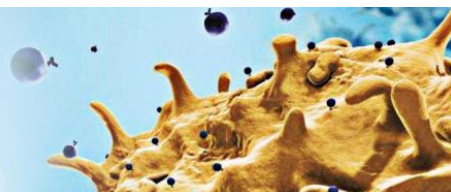
仅供研究使用，不可用于治疗或诊断。

-6-



Precision BioMedicals Co.,Ltd.

金准生物医药科技(天津)有限公司



- 1.在合适的培养基中制备用于刺激的目标细胞。
 - 2.细胞计数，以 $1-5 \times 10^6$ 个细胞/mL 在合适的培养基中重悬。
 - 3.向孔中加入含有适当刺激剂的 100 μ L 培养基。
 - 4.向孔中加入 100 μ L 细胞，并在所需的时间点 37°C 孵育。记住在 37°C 孵育未处理的细胞作为阴性对照。
 - 5.[可选]如果在固定之前需要表面染色（在步骤 6 中），则使用与抗甲醇荧光染料偶联的抗体，如“流式细胞细胞表面靶标染色操作步骤”中所述来染色细胞表面抗原
 - 6.在刺激期结束时，通过直接向孔中加入 200 μ L IC 固定液来固定细胞以停止刺激。
 - 7.黑暗中在室温下孵育平板 10-60 分钟。避光。
 - 8.室温 600 x g 离心平板 4-5 分钟。弃上清。
 - 9.将细胞沉淀重悬于残余体积中，并向孔中加入 100 μ L 预冷的 90-100% 甲醇。涡旋混合并在 2-8°C 或冰上孵育平板至少 30 分钟。
- 注意：一旦加入甲醇，细胞可以在 $\leq 20^\circ\text{C}$ 下储存长达 4 周。
- 10.加入 200 μ L 流式细胞术染色液，在室温下 600 x g 离心 4-5 分钟。弃上清。
 - 11.重复第 10 步
 - 12.[可选] 在染色前，使用纯化的抗小鼠 CD16/CD32 或人 FC 受体结合抑制剂封闭，可以阻断细胞的非特异性 FC 介导的结合。
 - 13.每孔加入推荐量的直接偶联抗体，并在室温下孵育 30-60 分钟。避光。
- 注：如果需要，可以同时进行表面染色和细胞内磷酸染色。由于并非所有抗体克隆都与固定的抗原决定簇结合，因此请参阅“固定/透化后抗体克隆性能”表。
- 14.加入 200 μ L 流式细胞术染色液，在室温下 600 x g 离心 4-5 分钟。弃上清。
 - 15.重复第 14 步。
 - 16.将染色细胞重悬于适当体积的流式细胞术染色液中。
 - 17.通过流式细胞术分析样品。