

最佳方案：流式细胞术 UltraComp 补偿微球方案

介绍

UltraComp eBeads™ 可与小鼠、大鼠和仓鼠来源的抗体发生反应，并且不依赖于免疫球蛋白轻链结合。每滴试剂含有两种微球：阳性群将捕获任何小鼠、大鼠或仓鼠抗体，而阴性群将不与抗体发生反应。向微球中加入荧光偶联抗体时，会有阳性群和阴性群。这种双峰分布在多色流式细胞实验中可用作单色补偿对照品。

UltraComp eBeads 与由蓝色（488 nm）、绿色（532 nm）、黄绿色（561 nm）、红色（633-635 nm）、紫外（355 nm）或紫色（405 nm）激光激发的所有荧光染料兼容。

Ultra Comp ebeads Plus 广泛用于多种物种和荧光染料，包括由紫外（355 nm）、紫色（405 nm）、蓝色（488 nm）、绿色（532 nm）、黄绿色（561 nm）和红色（633-640 nm）激光激发的所有荧光染料。Ultra Comp eBeads 经优化适用于与 Brilliant Violet 785/786、Brilliant Violet 711、Super Bright 780 和 Super Bright 702 偶联的抗体。

方案

材料

- 补偿微球：UltraComp eBeads（货号：[01-2222](#)）或 UltraComp eBeads Plus（货号：[01-3333-41](#)）
- 未染色细胞
- 一抗（直接偶联）
- 流式染色缓冲液（货号：[00-4222](#)）
- 12 x 75 mm 圆底试管

注意：此方案可以用于 OneComp eBeads（货号：01-1111）。

实验步骤

步骤 I：单色补偿对照品的制备

1. 给试管贴上荧光染料标签。
2. 用力颠倒至少 10 次或脉冲涡旋，将微球混合均匀。
3. 给每个试管贴上标签，脉冲涡旋 10 次。
4. 向每个试管中加入 1 滴 UltraComp eBeads。
5. 向每个试管中加入 1 次试验量或更少的抗体偶联物，混匀。
 - **注意：**UltraComp eBeads 与含有 PBS 或 HBSS、牛血清白蛋白（BSA）或 FBS 等蛋白和叠氮化钠的标准染色缓冲液兼容。请勿使用其他添加剂。
 - **注意：**一个试验是指用于细胞样本染色的抗体量（ μg ），最终体积为 100 μL 。如果在阴性微球群体中观察较高的背景，则可以减少抗体的用量。在这种情况下，建议用量不超过 0.125 μg 。由于抗体与阳性微球的结合与抗体的特异性无关，因此无需使用最佳浓度的抗体。对于大多数抗体，0.03–1.0 μg 的量即可得到适合的补偿值。

6. 轻弹、用力颠倒或脉冲涡旋混匀。
7. 在 2-8°C 下避光孵育 15-30 分钟。
8. 向每个试管中加入 2 mL 的流式染色缓冲液，400-600 x g 离心 3-5 分钟。
9. 倒出上清液，向每个试管中加入 0.2-0.4 mL 的流式染色缓冲液。
10. 分析前，轻弹或脉冲涡旋混匀样本。

步骤 II：设置补偿的一般原则

1. 在细胞仪上分析未染色的细胞。设置适当的正向散射（FSC）和侧向散射（SSC）以及荧光检测器（光电倍增管，PMT）的电压。
2. 分析微球样本：调节 FSC/SSC，使微球（甚至可以是单色微球）在显示界面上。可以调节 FSC/SSC 大小来观察微球。
3. 分析每个单色微球样本，确保阳性峰在正常范围内。如果微球的阳性峰超出正常范围，应尽可能降低 PMT 电压。检查所有单色微球确保阳性峰在正常范围之后，方可记录数据。
4. 分析每个单色微球样本，进行补偿设置，保存补偿对照品文件。
5. 重新设置细胞样本的 FSC/SSC，获取样本的结果。
6. 收集并保存样本结果。

注意：当物种是山羊和绵羊，应使用单色细胞和 FMO 对照品，不使用微球。

