

细胞内抗原染色——间接标记

A. 所需溶液和试剂

1. 磷酸盐缓冲液 (C01-01002): 0.1M PH7.4 1X PBS
2. 固定液: 4%多聚甲醛溶液(无甲醇)(C01-06001); 1%多聚甲醛溶液(无甲醇)(C03-02001)
3. 穿膜剂(C01-03001): 0.3% tritonX-100
4. 抗体封闭液 (C03-03001): 10%山羊血清溶液
5. 孵育缓冲液(C03-03002): 2% BSA 的 0.1M PBS
6. 抗体稀释液(C01-04001): 1% BSA, 0.03% Proclin300 的 0.1M PBS

B. 样本处理——固定穿膜

1. 离心收集细胞, 弃上清。
2. 将细胞重悬在 1 ml PBS(C01-01002)中。加入等体积甲醛溶液(C01-06001)至终浓度为 2%, 37℃ 固定 10 分钟。(或者用 70%的冰乙醇 5-10ML ,4℃ 固定 16 小时)
3. 放在冰上降温 1 分钟后加入 1 X PBS , 800rpm 离心 5min 去上清, 重复一次。
4. 细胞浆内抗体用 0.3% tritonX-100(C01-03001) 穿膜 5 分钟(若细胞核内的抗体标记, 用 90%的冰甲醇穿膜 30 分钟)。

C. 抗体标记

1. 将 $0.5-1 \times 10^6$ 个细胞分到各检测管中(依照体积)。
2. 各管加入 2 ml PBS(C01-01002), 200g 离心 5 分钟, 回收细胞。重复一次。
3. 向每支检测管中加入 100μl 孵育缓冲液 (C03-03002)重悬细胞。
4. 向每支样品管中加入经抗体稀释液(C01-04001)按合适比例稀释后的未标记、生物素标记一抗, 室温孵育 30 分钟。。
5. 加入 2 ml 孵育缓冲液, 200g 离心 5 分钟, 离心回收细胞; 重复一次。
6. 向每只检测管中加入 100μl 孵育缓冲液 (C03-03002)重悬细胞后加入 100μl 10%山羊血清的孵育缓冲液中 (C03-03001), 室温, 封闭 15 分钟。

7. 加入一定比例稀释的荧光素二抗。室温孵育 40 分钟。
8. 同第步骤 5。
9. 将细胞重悬在 1%多聚甲醛溶液（C03-02001）中然后用流式细胞仪检测。

注意：1) 甲醛溶液加入量为 1×10^6 cells / m L。2) 冰乙醇与冰甲醇的加入方法：向细胞中逐滴加入冰乙醇；向细胞中缓慢加入冰甲醇。3) 同型对照的设置。4) 标记前细胞计数。