

实验步骤:流式细胞技术(免疫荧光染色)

材料/试剂/缓冲液

1. 圆底试管 (12 x 75 mm)
2. 纯化一抗或标记一抗
3. 如果需要: 标记二抗
4. 如果是小鼠组织: 可以用Anti-CD16/CD32做Fc的封闭
5. 细胞染色液: 1X PBS, 5% FBS, 0.1% azide
6. 固定液 (1X PBS, 0.1% 福尔马林)
7. 渗透溶液 (1X PBS, 0.5% saponin)
8. 流式细胞仪的鞘液
9. 微量吸管与吸管尖
10. 冰桶或冰箱
11. 离心机
12. 流式细胞仪

方法

I 细胞表面抗原的免疫荧光染色

1. 收集并制备细胞或组织(脾脏、淋巴结、骨髓、胸腺等), 使之成为单一细胞的悬浮溶液, 加入细胞染色液, 于4°C离心350 x g, 4-5分钟, 之后丢弃上清液, 如果使用脾脏细胞, 需增加RBC裂解步骤, 最后用细胞染色液中止反应(*除了培养的细胞, 来自于组织的细胞, 必需用机械分离法或酵素消化法, 以产生单一细胞的悬浮溶液)
2. 用细胞染色液清洗细胞, 计算活细胞数目, 将细胞配制为 1×10^6 cell/ml的悬浮溶液, 取50 ul至试管中, 控制组须包含: 阴性对照(无染色组), 同种型对照(包含类似标记, 非专一的一抗), 以及阳性对照
3. 封闭Fc受体对于消除非专一性荧光染色是有帮助的, 如果是小鼠细胞, 染色之前, 每一百万个细胞可以加入0.5-1 ug的 anti-mouse CD16/CD32于冰上预先孵育5-10分钟, 以封闭非专一的染色
4. 加入适当稀释后的标记、纯化, 或生物素化的一抗, 置于黑暗处于冰上孵育15-30分钟
5. 以2 ml细胞染色液清洗细胞, 于4°C离心(350-400 x g), 5分钟, 总共洗三次
6. 以500 ul细胞染色液将细胞悬浮, 之后可以上机分析细胞
7. 如果使用纯化或biotin标记一抗, 于100 ul的染色液中加入适量的二步骤中的细胞悬浮溶液, 置于黑暗处于4°C孵育15-30分钟, 重复步骤5与6
8. 加入细胞存活染料, 细胞存活度须> 90%

II 细胞内抗原的免疫荧光染色

1. 制备欲分析的细胞样品, 如果需要可照上面列出的细胞表面抗原染色步骤, 先进行细胞表面抗原染色
2. 加入100 ul固定液, 于4°C孵育15-30分钟, 离心并小心吸除上清液
3. 加入100 ul渗透溶液, 接着加入荧光标记的一抗, 置于黑暗处于4°C孵育30分钟, 小心处理渗透过后的细胞, 离心并吸除上清液
4. 以细胞染色液清洗细胞两次, 每次皆须离心并吸除上清液
5. 以500 ul细胞染色液将细胞悬浮, 之后可以用流式细胞仪分析细胞

注意: 固定与渗透处理步骤将会造成FSC/SSC的分布图与活细胞有显著差异



GeneTex 简介

ABOUT

GeneTex 背景

1997年GeneTex由一群科学家成立于美国德克萨斯州,为抗体制造商,成立宗旨“专注生物相关试剂生产,加速科学研究与发展,在每一个产品里你将看到我们对质量的要求与坚持”。

成立之初,科学家致力于寻找引发癌症的分子新靶点,并开发抗体供科研使用。之后, GeneTex专注抗体开发,网罗世界各地人才,至今已开发出50,000个产品,产品线横跨癌症、病毒、遗传学、神经学、免疫学、细胞分子传递、干细胞研究、斑马鱼等多个领域,并提供完善的定制抗体制备服务。

GeneTex 承诺

在我们制造产品时,坚持我们的理念与方法,通过研究、开发与严格的测试提供最可信的试剂给研究人员,并驱动生命科学的发展。我们将持续开发多元的抗体产品,提供科学家探索有限生物医药知识所使用。

GeneTex 联系

任何跟产品相关的问题,我们技术与销售团队将竭诚为您服务; GeneTex支持中英文等多种语言并建构全球经销商网络,任何问题,您可以使用习惯的语言与我们联系。

