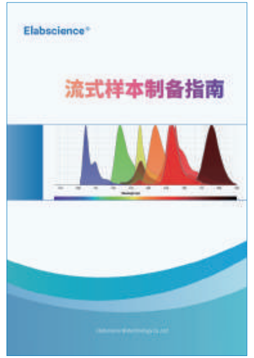
Elabscience®



流式样本制备指南

流式配色画册

武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司
Elabscience Biotechnology Co., Ltd

www.elabscience.cn
027-6502-2280 / 400-9627-365
Flow@elabscience.cn
武汉市高新大道858号光谷生物医药产业园二期B18栋

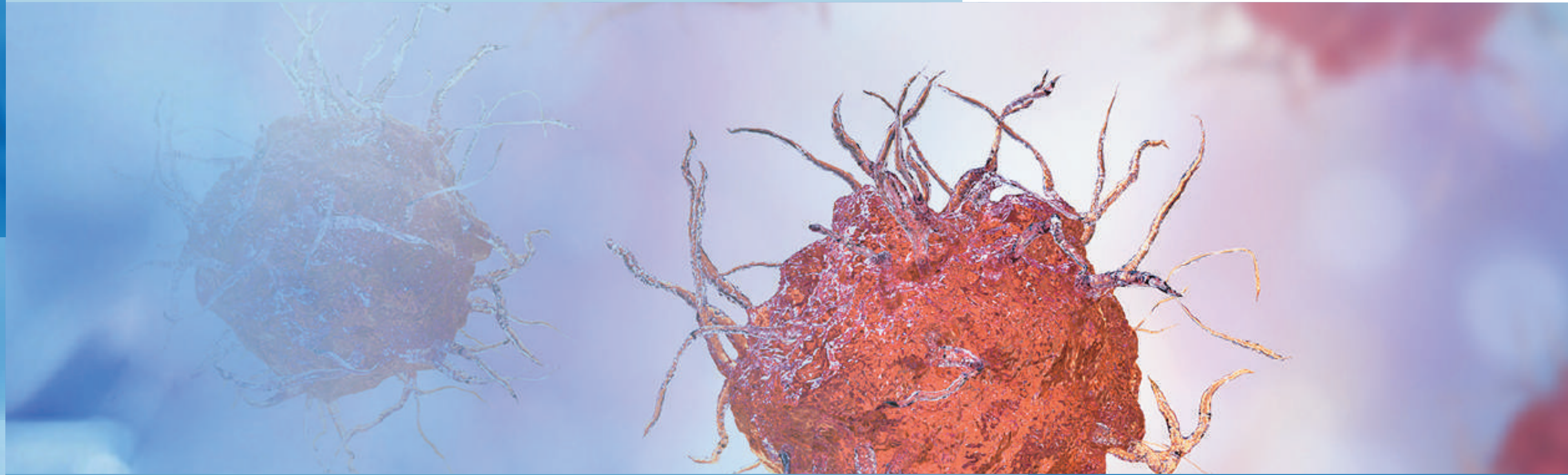
关注微信公众号

技术支持二维码

Elabscience®

免疫细胞分型手册 I

- 常见免疫细胞分型鉴定
- 流式染色流程
- Elabscience®流式特色服务

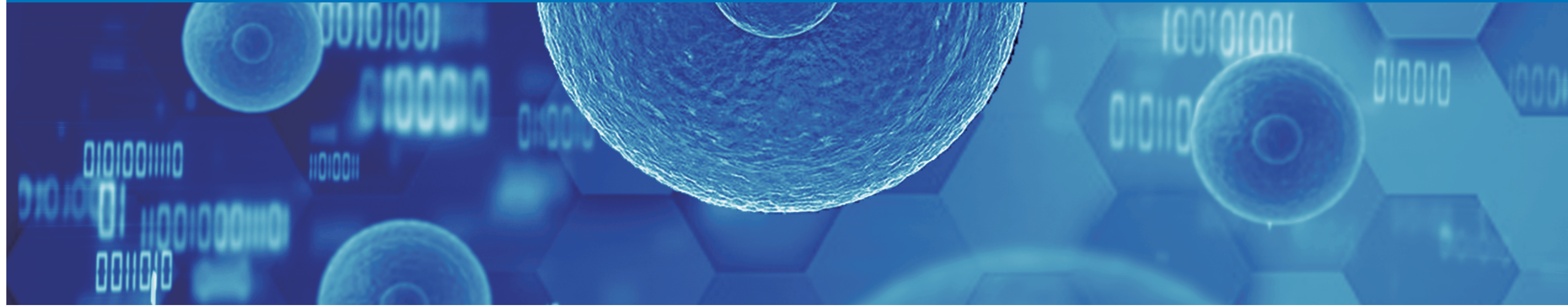


ABOUT US

公司介绍

武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司（Elabscience Biotechnology Co.,Ltd)是一家专注于免疫检测类试剂的高科技生物公司，总部位于国家生物产业基地——光谷生物城，建有美国休斯顿研发中心，主要产品为流式抗体、ELISA试剂盒、抗体、生化试剂盒、标记试剂盒、细胞相关检测试剂和其它试剂，已畅销至全球150多个国家和地区。

43项	11000⁺篇	51000⁺
已授权专利	文献引用数量	总影响因子



目录

CONTENTS

Elabscience®

常见免疫细胞分型鉴定

T/B/NK细胞群检测

淋巴细胞(T/B/NK)是机体免疫应答功能的重要细胞成分，通常可分为 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞和自然杀伤 (NK) 细胞。根据 T/B/NK 细胞水平的变化，可以评估机体免疫功能的状态。

细 胞	功 能
T淋巴细胞	· 参与细胞免疫，直接杀伤病原体细胞； · 释放淋巴因子，增强机体的免疫效应。
B淋巴细胞	· 参与体液免疫，产生抗体； · 提呈可溶性抗原； · 产生细胞因子参与免疫调节。
NK细胞	· 杀伤病毒感染或肿瘤等靶细胞； · 分泌细胞因子参与免疫调节。

表1：不同淋巴细胞的功能

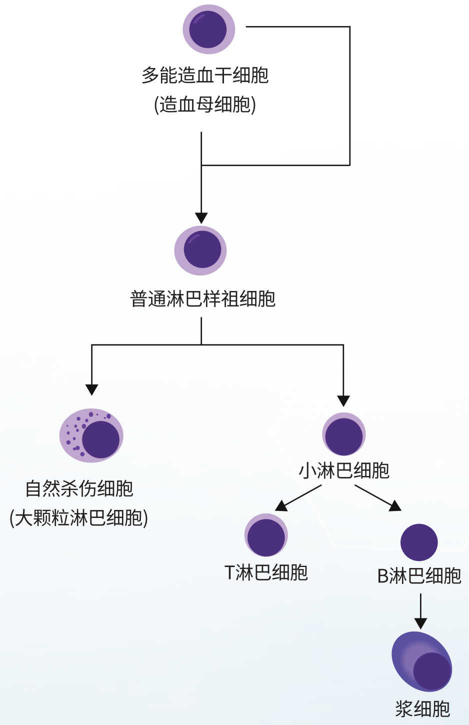


图1：淋巴细胞的分化

(图片来源于《医学免疫学》)

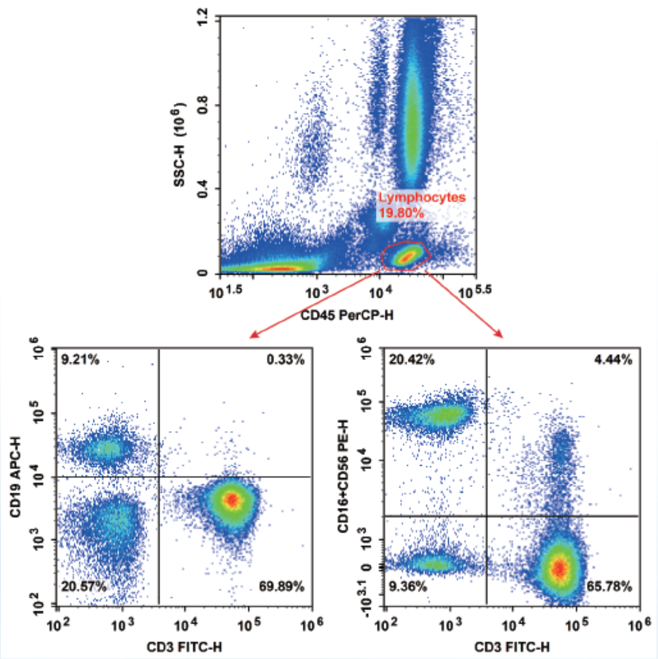
人外周血T/B/NK(4色)检测

01 Panel Design&样本管设置

目 的	样 本	设 置
调电压	1	Blank(空白管)
调补偿	2	CD45-PerCP
	3	CD3-FITC
	4	CD16-PE、CD56-PE
	5	CD19-APC
PE-FMO联合同型对照划门	6	CD45-PerCP、CD3-FITC、CD19-APC、Mouse IgG1, κ Isotype Control-PE
Full Panel	7	CD45-PerCP、CD3-FITC、CD16-PE、CD56-PE 、CD19-APC

02 流式抗体信息

指 标	荧光标记	克隆号	货号
CD45	PerCP	HI30	E-AB-F1137F
CD3	FITC	OKT3	E-AB-F1001C
CD16	PE	3G8	E-AB-F1236D
CD56	PE	5.1H11	E-AB-F1239D
CD19	APC	CB19	E-AB-F1004E
Mouse IgG1, κ Isotype Control	PE	MOPC-21	E-AB-F09792D



Tips：

- 此染色方案细胞分群明显，不设置单阳管也可以进行补偿调节，但对于流式初学者，建议最好设置单阳管调节补偿。
- NK 细胞的检测标准是 $CD3^{-}CD16^{+}/CD56^{+}$。
- 此方案中 CD16 和 CD56 最好要有同型对照，其它指标因分群明显可以省去。
- 人外周血样本建议染 CD45，通过 CD45 与 SSC，有利于淋巴细胞圈门。可以利用 CD45 的单染管，低速上机，设置阈值。

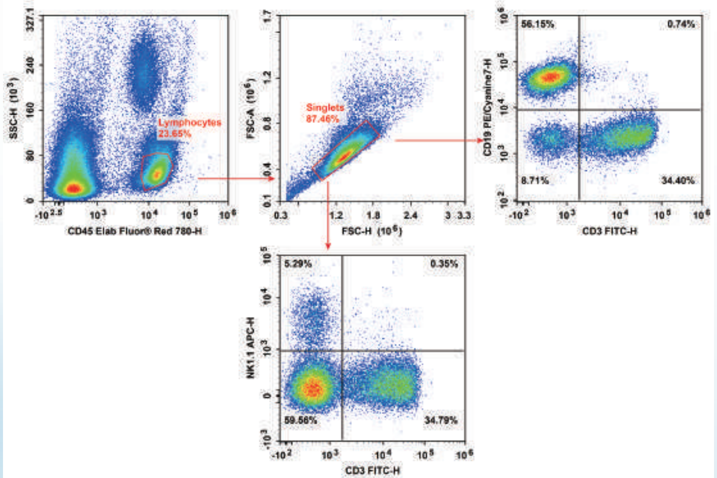
C57小鼠外周血T/B/NK（4色）检测

01 Panel Design&样本管设置

目 的	样 本	设 置
调电压	1	Blank（空白管）
调补偿	2	CD45-Elab Fluor® Red 780
	3	CD3-FITC
	4	CD19-PE/Cyanine7
	5	NK1.1-APC
APC-FMO联合同型对照划门	6	CD45-Elab Fluor® Red 780、CD3-FITC、CD19-PE/Cyanine7、Mouse IgG2a, κ Isotype Control-APC
Full Panel	7	CD45-Elab Fluor® Red 780、CD3-FITC、CD19-PE/Cyanine7、NK1.1-APC

02 流式抗体信息

指 标	荧光标记	克隆号	货号
CD45	Elab Fluor® Red 780	30-F11	E-AB-F1136S
CD3	FITC	17A2	E-AB-F1013C
CD19	PE/Cyanine7	1D3	E-AB-F0986H
NK1.1	APC	PK136	E-AB-F0987E
Mouse IgG2a, κ Isotype Control	APC	C1.18.4	E-AB-F09802E



Tips：

- 外周血样本增加 CD45 指标，直接通过 CD45 和 SSC 圈出淋巴细胞群。
- CD3/CD4/CD8 细胞分群明显，即使没有同型对照也能很好的区分阴阳性细胞群。
- NK 细胞的检测指标需根据不同小鼠的品种来选择，C57BL/6 小鼠使用 NK1.1，BALB/c 小鼠使用 CD49b（DX5），分析时圈 $CD3^-$ $NK1.1^+$/$CD49b^+$。
- 该实验的关键因素为红细胞裂解，红细胞裂解过度或者裂解不足，均会导致淋巴细胞群分群不明显。

Elabscience®

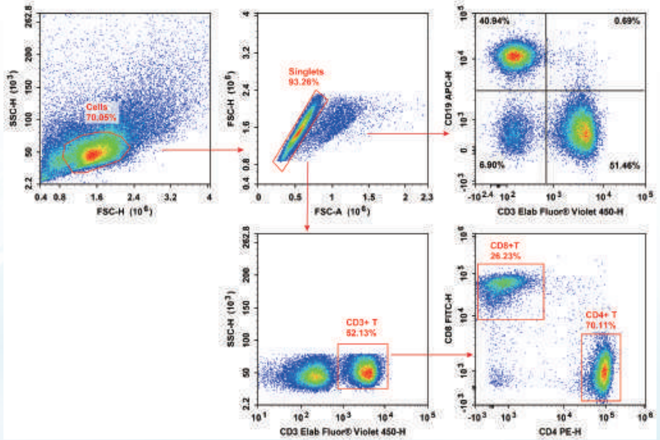
小鼠淋巴结T/B细胞（4色）检测

01 Panel Design&样本管设置

目 的	样 本	设 置
调电压	1	Blank（空白管）
Full Panel	2	CD3-Elab Fluor® Violet 450、CD4-PE、CD8a-FITC、CD19-APC

02 流式抗体信息

指 标	荧光标记	克隆号	货号
CD3	Elab Fluor® Violet 450	17A2	E-AB-F1013Q
CD4	PE	GK1.5	E-AB-F1097D
CD8a	FITC	53-6.7	E-AB-F1104C
CD19	APC	1D3	E-AB-F0986E



Tips：

- 淋巴结内主要是淋巴细胞，故无需 CD45 圈门。
- CD3/ CD4/ CD8/ CD19 细胞分群明显，不需要做单阳管调节补偿、FMO及同型对照划门。

Elabscience®

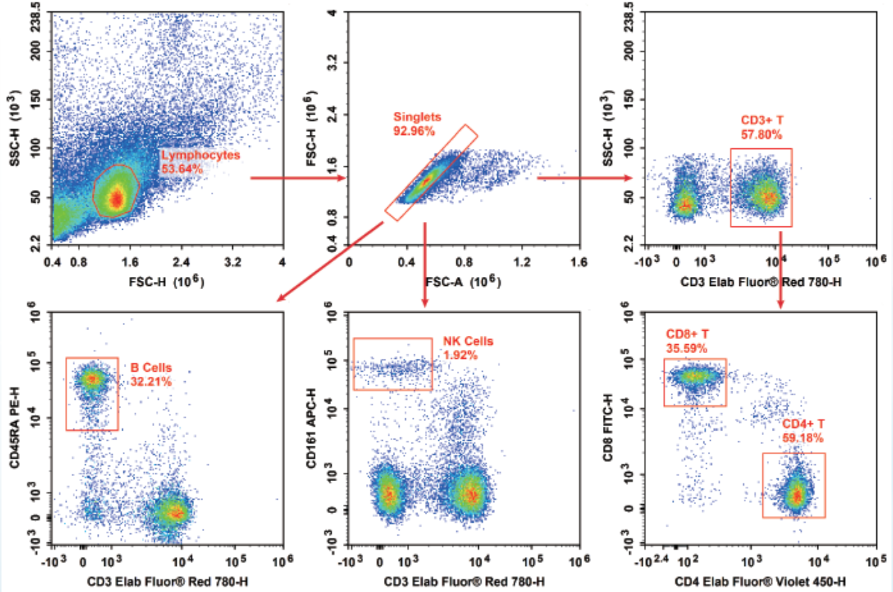
大鼠脾脏T/B/NK(5色)检测

01 Panel Design&样本管设置

目 的	样 本	设 置
调电压	1	Blank(空白管)
调补偿	2	CD3-Elab Fluor® Red 780
	3	CD4-Elab Fluor® Violet 450
	4	CD8-FITC
	5	CD45RA-PE
	6	CD161-APC
APC-FMO联合同型对照划门	7	CD3-Elab Fluor® Red 780、CD4-Elab Fluor® Violet 450、CD8-FITC、CD45RA-PE、Mouse IgG1, κ Isotype Control-APC
PE-FMO联合同型对照划门	8	CD3-Elab Fluor® Red 780、CD4-Elab Fluor® Violet 450、CD8-FITC、CD161-APC、Mouse IgG1, κ Isotype Control-PE
Full Panel	9	CD3-Elab Fluor® Red 780、CD4-Elab Fluor® Violet 450、CD8-FITC、CD45RA-PE、CD161-APC

02 流式抗体信息

指 标	荧光标记	克隆号	货号
CD3	Elab Fluor® Red 780	G4.18	E-AB-F1228S
CD4	Elab Fluor® Violet 450	OX-38	E-AB-F1105Q
CD8	FITC	OX-8	E-AB-F1098C
CD45RA	PE	OX-33	E-AB-F1306D
CD161	APC	3.2.3	E-AB-F1307E
Mouse IgG1, κ Isotype Control	PE	MOPC-21	E-AB-F09792D
Mouse IgG1, κ Isotype Control	APC	MOPC-21	E-AB-F09792E



Tips:

- CD3/CD4/CD8 细胞分群明显，即使没有同型对照也能很好的区分阴阳性细胞群。
- CD45RA 和 CD161 建议加同型对照圈门。
- 大鼠 B 细胞表型为 $CD3^-CD45RA^+$，NK 细胞表型为 $CD3^-CD161^+$。

Elabscience®

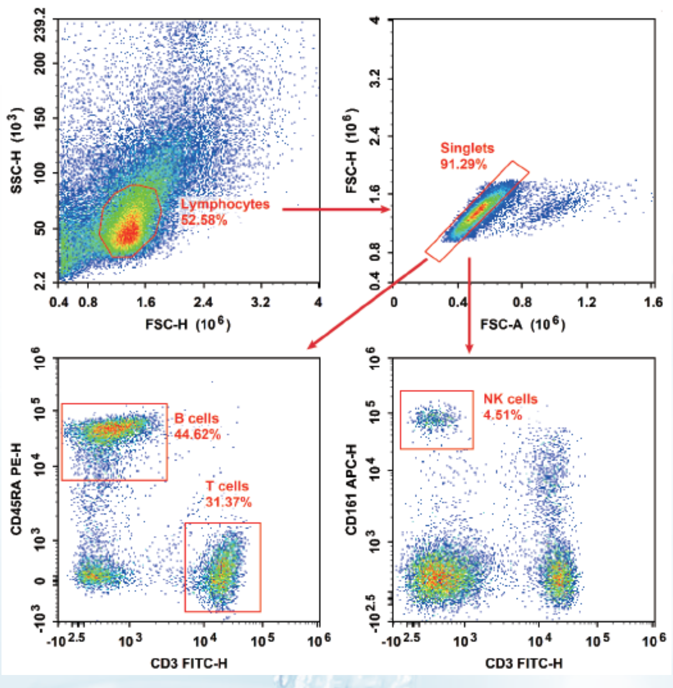
大鼠脾脏T/B/NK（3色）检测

01 Panel Design&样本管设置

目 的	样 本	设 置
调电压	1	Blank（空白管）
调补偿	2	CD3-FITC
	3	CD45RA-PE
	4	CD161-APC
APC-FMO联合 同型对照划门	5	CD3-FITC、CD45RA-PE、Mouse IgG1, κ Isotype Control-APC
PE-FMO联合 同型对照划门	6	CD3-FITC、CD161-APC、Mouse IgG1, κ Isotype Control-PE
Full Panel	7	CD3-FITC、CD45RA-PE、CD161-APC

02 流式抗体信息

指 标	荧光标记	克隆号	货号
CD3	FITC	G4.18	E-AB-F1228C
CD45RA	PE	OX-33	E-AB-F1306D
CD161	APC	3.2.3	E-AB-F1307E
Mouse IgG1, κ Isotype Control	PE	MOPC-21	E-AB-F09792D
Mouse IgG1, κ Isotype Control	APC	MOPC-21	E-AB-F09792E



Tips：

- 大鼠 B 细胞表型为 CD3$^-$CD45RA$^+$，NK 细胞表型为 CD3$^-$CD161$^+$。
- CD45RA 和 CD161 建议加同型对照圈门。

CD4$^+$/CD8$^+$T细胞群检测

根据功能，T细胞分为：

- **CD4$^+$T细胞：** 分泌各种细胞因子参与免疫作用；机体抗病毒、抗肿瘤免疫的重要防线。
- **CD8$^+$T细胞：** 分泌穿孔素、颗粒酶等物质直接杀伤细胞；通过Fas-FasL途径或TNF-TNFR途径诱导靶细胞凋亡。

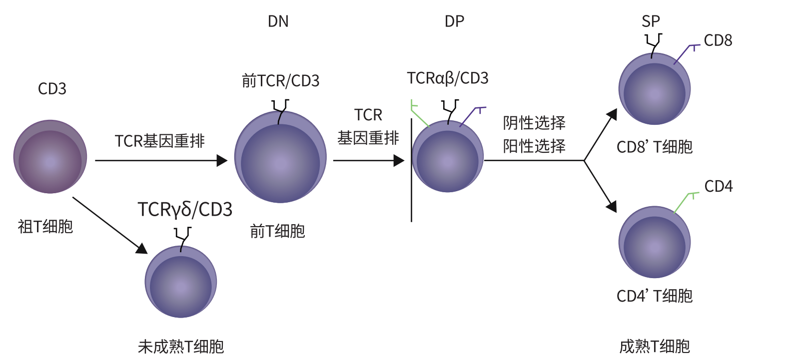


图2：T细胞在胸腺中的发育过程

（图片来源于《医学免疫学》）

DN：双阴性（CD4$^-$CD8$^-$）；

DP：双阳性（CD4$^+$CD8$^+$）；

SP：单阳性（CD4$^+$CD8$^-$或CD4$^-$CD8$^+$）。

Elabscience®

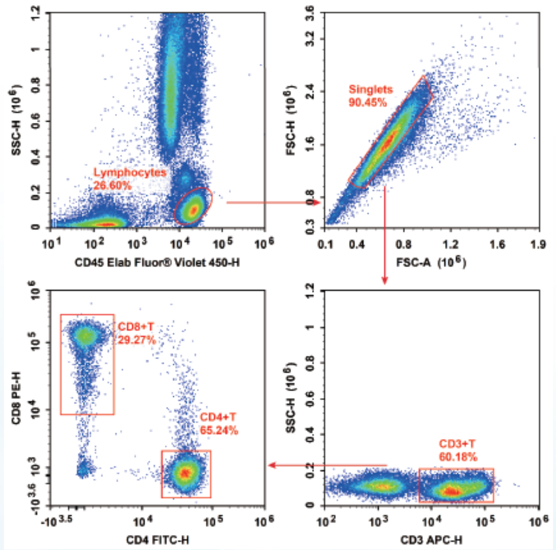
人外周血T细胞（4色）检测

01 Panel Design&样本管设置

目 的	样 本	设 置
调电压	1	Blank（空白管）
Full Panel	2	CD45-Elab Fluor® Violet 450、CD3-APC、CD4-FITC、CD8a-PE

02 流式抗体信息

指 标	荧光标记	克隆号	货号
CD45	Elab Fluor® Violet 450	HI30	E-AB-F1137Q
CD3	APC	OKT3	E-AB-F1001E
CD4	FITC	RPA-T4	E-AB-F1109C
CD8a	PE	OKT-8	E-AB-F1110D



Tips：

- 做人外周血T细胞的检测，建议染色时加入CD45，可以较容易圈出淋巴细胞群。
- 以上配色方案细胞分群很明显，不需要做单染管调节补偿。

小鼠胸腺T细胞（2色）检测

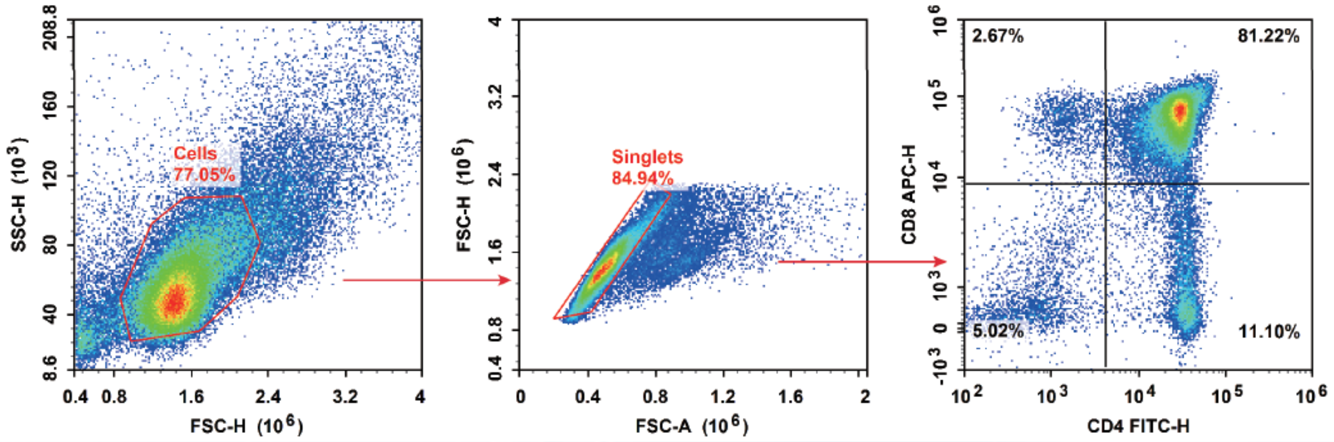
01 Panel Design&样本管设置

目 的	样 本	设 置
调电压	1	Blank（空白管）
APC-FMO联合同型对照划门	2	CD4-FITC、Rat IgG2a, κ Isotype Control-APC
FITC-FMO联合同型对照划门	3	CD8a-APC、Rat IgG2b, κ Isotype Control-FITC
Full Panel	4	CD4-FITC、CD8a-APC

02 流式抗体信息

指 标	荧光标记	克隆号	货 号
CD4	FITC	GK1.5	E-AB-F1097C
CD8a	APC	53-6.7	E-AB-F1104E
Rat IgG2b, κ Isotype Control	FITC	LTF-2	E-AB-F09842C
Rat IgG2a, κ Isotype Control	APC	2A3	E-AB-F09832E

Elabscience®



Tips：

- 根据 CD4 和 CD8 的表达来分类，胸腺中的 T 细胞又可以分为双阴性细胞（DN 细胞，double negative cell），即 $CD4^-CD8^-$；双阳性细胞（DP 细胞，double positive cell），即 $CD4^+CD8^+$；单阳性细胞（SP 细胞，single positive cell），即 $CD4^+CD8^-$ 或 $CD4^-CD8^+$。
- 胸腺中绝大部分的 T 细胞是共表达 CD4 和 CD8，配色时选择 FITC 和 APC 两个无干扰的荧光组合，可以减少数据分析的复杂程度。
- FITC 和 APC 之间没有干扰，所以该实验无需设置单阳对照调补偿。

Elabscience®

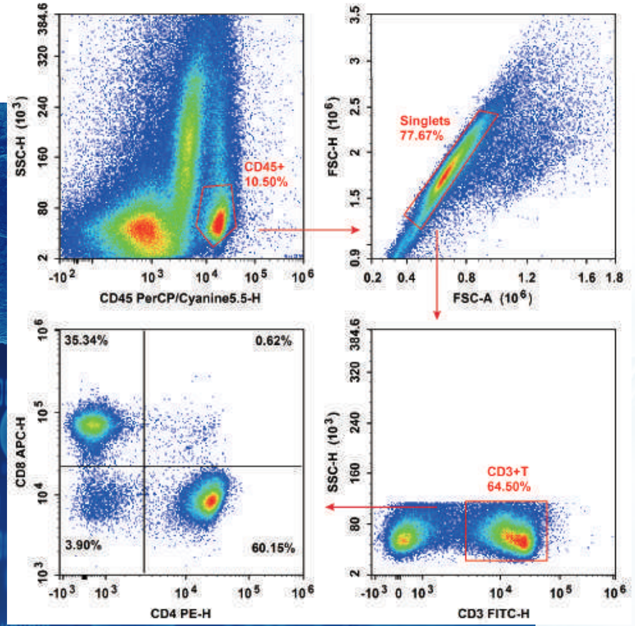
小鼠肿瘤浸润淋巴细胞(4色)检测

01 Panel Design&样本管设置

目 的	样 本	设 置
调电压	1	Blank(空白管)
调补偿	2	CD45-PerCP/Cyanine5.5
	3	CD3-FITC
	4	CD4-PE
	5	CD8-APC
Full Panel	6	CD45-PerCP/Cyanine5.5、CD3-FITC、CD4-PE、CD8a-APC

02 流式抗体信息

指 标	荧光标记	克隆号	货号
CD45	PerCP/Cyanine5.5	30-F11	E-AB-F1136J
CD3	FITC	17A2	E-AB-F1013C
CD4	PE	GK1.5	E-AB-F1097D
CD8a	APC	53-6.7	E-AB-F1104E



Tips:

- 肿瘤组织中，大部分为肿瘤细胞，淋巴细胞的比例相对较低，可通过 CD45 联合 SSC 圈出淋巴细胞群。
- 肿瘤细胞中淋巴细胞门，在 CD45/SSC 散点图上，被定义为 $CD45^{high}$、SSC^{low} 的门。

Elabscience®

Treg细胞群检测

Treg(调节性 T 细胞)是免疫系统的重要调节细胞，对维持自身耐受性和免疫细胞稳态至关重要。目前，最常用的鉴别 Tregs 的标志 Marker 是 CD4、CD25、CD127 和 Foxp3。Treg 在免疫耐受、自身免疫病、感染性疾病、器官移植及肿瘤等多种疾病中发挥重要的作用。

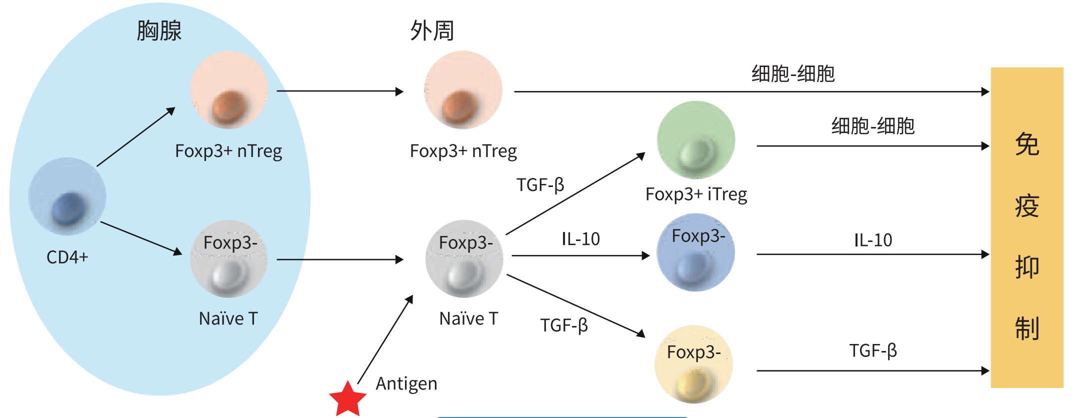


图3:Treg细胞发育流程

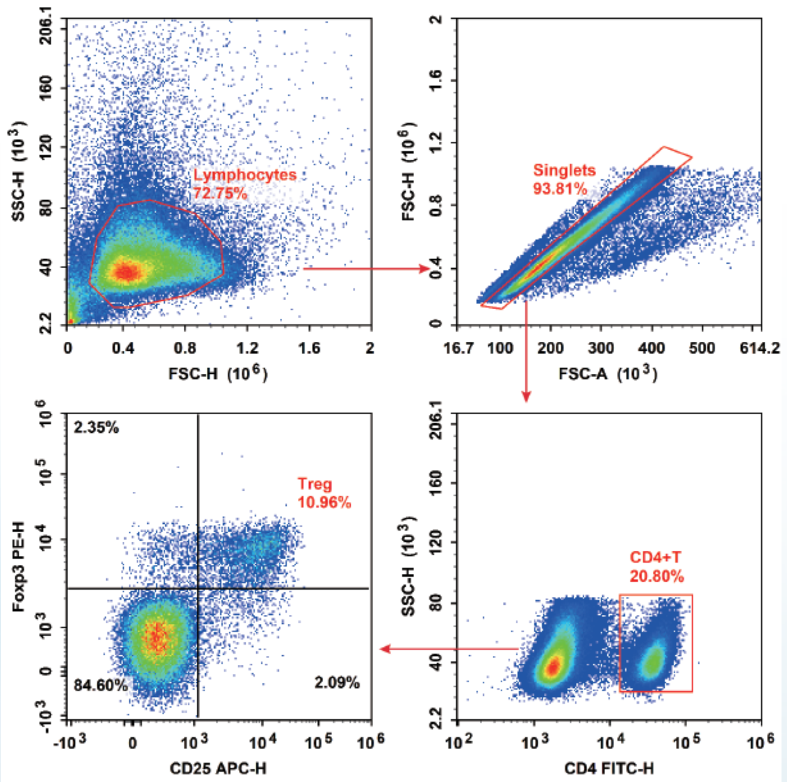
小鼠脾脏Treg(3色)检测

01 Panel Design&样本管设置

目 的	样 本	设 置
调电压	1	Blank(空白管)
调补偿	2	CD4-FITC
	3	CD25-APC
	4	Foxp3-PE
APC-FMO联合同型对照划门	5	CD4-FITC、Foxp3-PE、Rat IgG1, κ Isotype Control-APC
PE-FMO联合同型对照划门	6	CD4-FITC、CD25-APC、Mouse IgG1, κ Isotype Control-PE
Full Panel	7	CD4-FITC、CD25-APC、Foxp3-PE

02 流式抗体信息

指 标	荧光标记	克隆号	货号
CD4	FITC	GK1.5	E-AB-F1097C
CD25	APC	PC-61.5.3	E-AB-F1102E
Foxp3	PE	3G3	E-AB-F1238D
Rat IgG1, κ Isotype Control	APC	HRPN	E-AB-F09822E
Mouse IgG1, κ Isotype Control	PE	MOPC-21	E-AB-F09792D



Tips:

- 小鼠 Treg 的标记是 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺。
- CD4 分群明显，无需同型对照，CD25 和 Foxp3 分群不明显，需同型对照。
- 荧光素间有溢漏，故需要设置单阳管用于调节补偿。
- 破膜剂使用不当会造成很高的背景以及细胞分群不明显。

Elabscience®

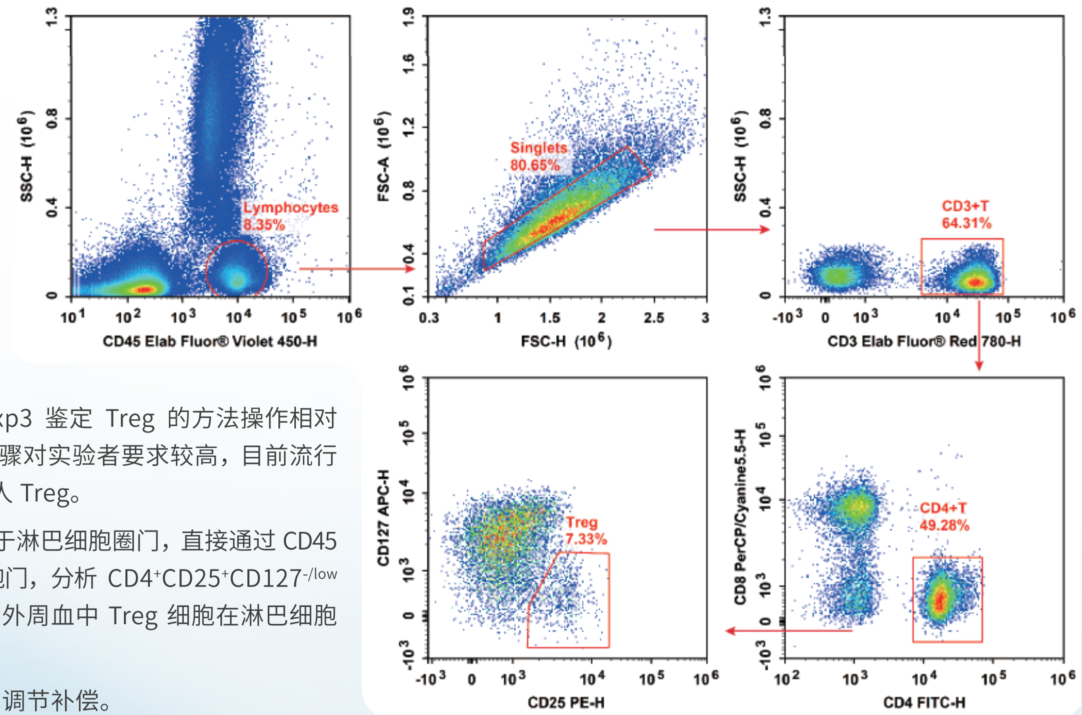
人外周血Treg(6色)检测

01 Panel Design&样本管设置

目 的	样 本	设 置
调电压	1	Blank(空白管)
调补偿	2	CD45-Elab Fluor® Violet 450
	3	CD3-Elab Fluor® Red 780
	4	CD4-FITC
	5	CD8a-PerCP/Cyanine5.5
	6	CD25-PE
	7	CD127-Elab Fluor®647
Full Panel	8	CD45-Elab Fluor® Violet 450、CD3-Elab Fluor® Red 780、CD4-FITC、CD8a-PerCP/Cyanine5.5、CD25-PE、CD127-Elab Fluor®647

02 流式抗体信息

指 标	荧光标记	克隆号	货号
CD45	Elab Fluor® Violet 450	HI30	E-AB-F1137Q
CD3	Elab Fluor® Red 780	OKT3	E-AB-F1001S
CD4	FITC	RPA-T4	E-AB-F1109C
CD8a	PerCP/Cyanine5.5	OKT-8	E-AB-F1110J
CD25	PE	BC96	E-AB-F1194D
CD127	Elab Fluor®647	A019D5	E-AB-F1152M



Tips:

- 传统的通过检测 Foxp3 鉴定 Treg 的方法操作相对复杂，且固定破膜步骤对实验者要求较高，目前流行通过 CD127 来检测人 Treg。
- 增加 CD45 指标，便于淋巴细胞圈门，直接通过 CD45 和 SSC 圈出淋巴细胞门，分析 $CD4^{+}CD25^{+}CD127^{-/low}$ 的细胞比例，正常人外周血中 Treg 细胞在淋巴细胞中占比为 3%~10%。
- 需要设置单阳管用于调节补偿。

Th1/Th2/Th17细胞群检测

Th 细胞（辅助性 Th 细胞），主要通过不同亚群的相互作用活化巨噬细胞和其他免疫细胞吞噬和清除抗原。其主要分类有：Th1、Th2、Th17 等。

- **Th1细胞：**分泌的细胞因子增强细胞介导的抗感染免疫。
- **Th2 细胞：**辅助B细胞活化，其分泌的细胞因子也可促进B细胞的增殖、分化和抗体的生成；Th2在超敏反应及抗寄生虫感染中也发挥重要作用。

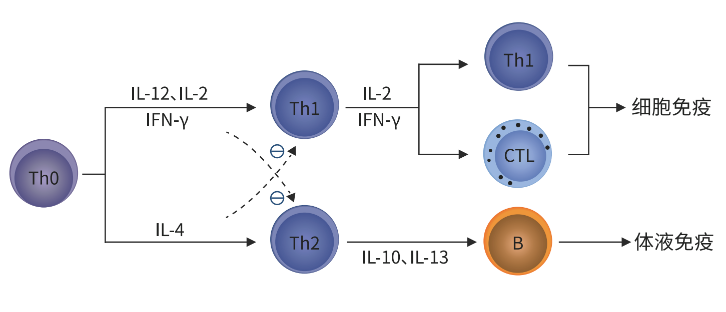


图4：细胞因子对Th1、Th2细胞亚群的调节作用

（图片来源于《医学免疫学》）

Elabscience®

◉ **Th17细胞：**可分泌多种细胞因子参与固有免疫和某些炎症的发生，研究表明，Th17细胞具有致病和非致病两面性的不同功能，在自身免疫中发挥着重要调节作用。

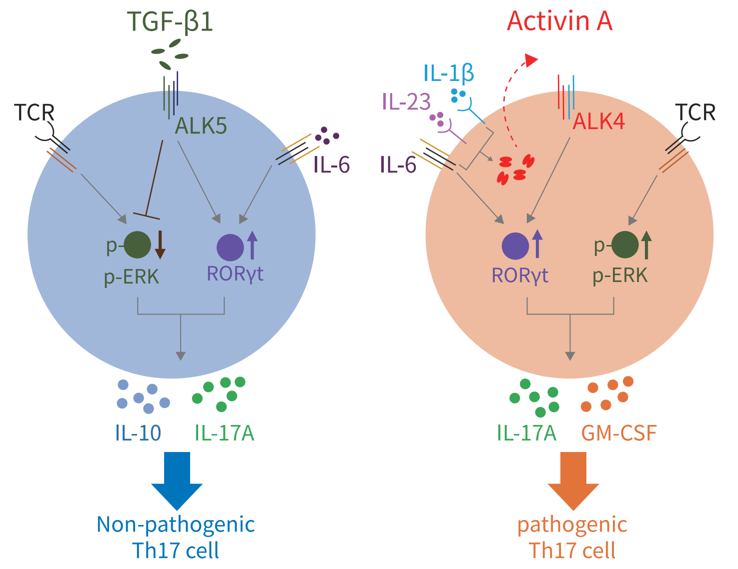


图5：Th17细胞的分化和功能

图片来源：Wu B，Zhang S，Guo Z，et al. The TGF-beta superfamily cytokine Activin-A is induced during autoimmune neuroinflammation and drives pathogenic Th17 cell differentiation[J]. *Immunity*，2021(2):54.

人外周血PBMC Th1/Th2（4色）检测

01 Panel Design&样本管设置

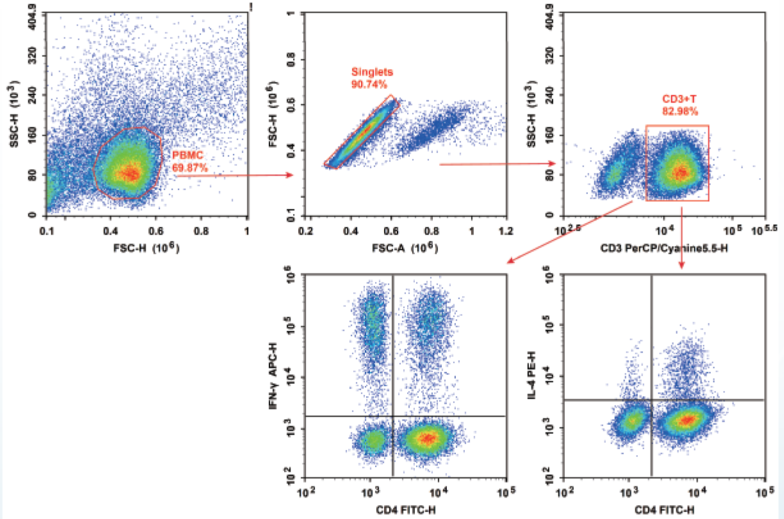
目 的	样 本	设 置
调电压	1	Blank（空白管）
调补偿	2	CD3-PerCP/Cyanine5.5
	3	CD4-FITC
	4	IFN-γ-APC
	5	IL-4-PE
APC-FMO联合同型对照划门	6	CD3-PerCP/Cyanine5.5、CD4-FITC、IL-4-PE、Mouse IgG1，κ Isotype Control-APC
PE-FMO联合同型对照划门	7	CD3-PerCP/Cyanine5.5、CD4-FITC、IFN-γ-APC、Rat IgG1，κ Isotype Control-PE
Full Panel	8	CD3-PerCP/Cyanine5.5、CD4-FITC、IFN-γ-APC、IL-4-PE

02 流式抗体信息

指 标	荧光标记	克隆号	货 号
CD3	PerCP/Cyanine5.5	UCHT1	E-AB-F1230J
CD4	FITC	SK3	E-AB-F1352C
IFN-γ	APC	B27	E-AB-F1196E
IL-4	PE	MP4-25D2	E-AB-F1203D
Mouse IgG1，κ Isotype Control	APC	MOPC-21	E-AB-F09792E
Rat IgG1，κ Isotype Control	PE	HRPN	E-AB-F09822D

Tips：

- PBMC分选后，需要先用细胞因子刺激阻断剂进行刺激阻断培养（本实验用到试剂为：细胞因子激活和蛋白阻断试剂盒（E-CK-A091）；培养条件为：刺激剂刺激培养1 h后加入阻断剂，再培养4.5 h），再收集细胞进行后续流式实验。
- PMA 刺激会导致人T细胞表面CD4部分内吞，因此我们需要选用对内吞影响小的 CD4 克隆号抗体SK3。
- IFN-γ、IL-4 需要做同型对照，因为一般情况下细胞因子表达量不高。
- Th1 细胞表型为 CD3$^+$CD4$^+$IFN-γ$^+$，Th2 细胞表型为CD3$^+$CD4$^+$IL-4$^+$。
- 破膜剂对细胞损伤较大，建议离心后形成的细胞沉淀先弹散成细胞悬液后再加入破膜剂，以减少细胞损伤。



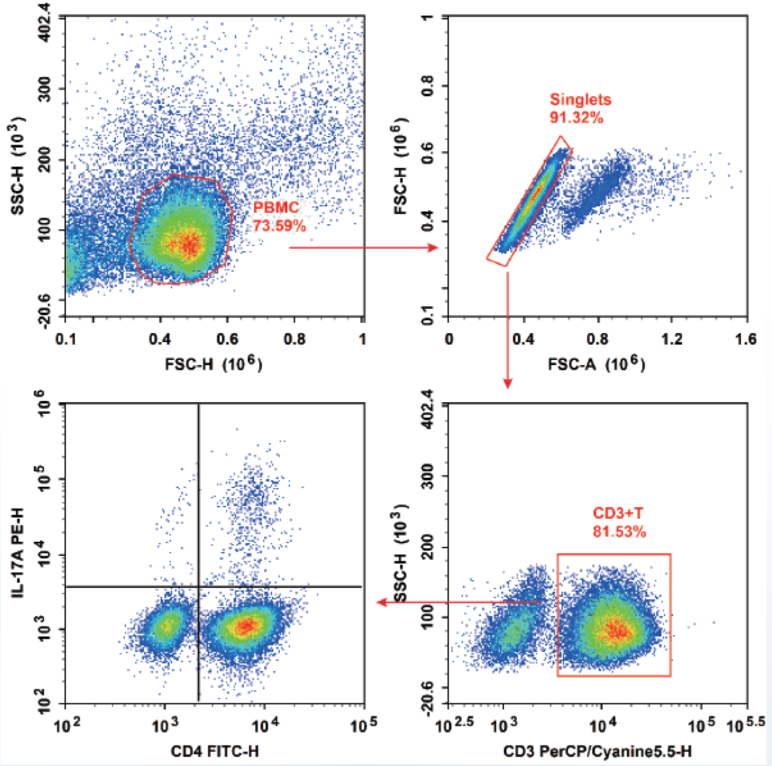
人外周血PBMC Th17（3色）检测

01 Panel Design&样本管设置

目 的	样 本	设 置
调电压	1	Blank（空白管）
调补偿	2	CD3-PerCP/Cyanine5.5
	3	CD4-FITC
	4	IL-17A-PE
PE-FMO联合同型对照划门	5	CD3-PerCP/Cyanine5.5、CD4-FITC、Rat IgG1, κ Isotype Control-PE
Full Panel	6	CD3-PerCP/Cyanine5.5、CD4-FITC、IL-17A-PE

02 流式抗体信息

指 标	荧光标记	克隆号	货 号
CD3	PerCP/Cyanine5.5	UCHT1	E-AB-F1230J
CD4	FITC	SK3	E-AB-F1352C
IL-17A	PE	BL168	E-AB-F1173D
Mouse IgG1, κ Isotype Control	PE	MOPC-21	E-AB-F09792D



Tips:

- PBMC分选后，需要先用细胞因子刺激阻断剂进行刺激阻断培养（本实验用到试剂为：细胞因子激活和蛋白阻断试剂盒（E-CK-A091）；培养条件为：刺激剂刺激培养1 h后加入阻断剂，再培养4.5 h），再收集细胞进行后续流式实验。
- PMA 刺激会导致人 T 细胞表面 CD4 部分内吞，因此我们需要选用对内吞影响小的 CD4 克隆号抗体 SK3。
- IL-17A 需要做同型对照，因为一般情况下细胞因子表达量不高。
- Th17 细胞表型为 $CD3^{+}CD4^{+}$ IL-$17A^{+}$。
- 破膜剂对细胞损伤较大，建议离心后形成的细胞沉淀先弹散成细胞悬液后再加入破膜剂，以减少细胞损伤。

流式染色流程

- 细胞表面抗原染色流程
  - 全血染色流程
  - 单细胞悬液染色流程
- 细胞内细胞因子染色流程
- 细胞核内因子染色流程

流式实验染色的流程会因检测指标表达部位的不同而有所不同。Elabscience® 根据指标表达位置整理出相应的流式实验染色步骤，供广大客户参考。

细胞表面抗原染色流程

全血染色流程

单细胞悬液染色流程

1. 将实验所需组织（脾脏、骨髓、淋巴结、胸腺）制备成单细胞悬液（详情可参考 Elabscience® 流式样本制备指南或 Elabscience® 官网：www.elabscience.cn）。
2. 用血球计数板或其他仪器对悬液进行计数后，调整细胞浓度至 1×10⁷/mL。
3. 取 100 μL 细胞 / 管（约 1×10⁶ 个细胞）于流式管内。
4. （FcR 封闭，步骤可选）封闭 Fc 受体能减少染色过程中的非特异性染色。

   对于小鼠样本， 纯化的 CD16/CD32 单抗能和 FcγRIII/ II 结合，封闭非特异性染色，使阴性细胞的背景荧光降至未标记细胞的水平。加入 0.5-1 μg 纯的抗小鼠 CD16/32 单克隆抗体（E-AB-F0997A），室温孵育 10 min。

   对于大鼠样本， 可使用过量的与荧光抗体相同来源和亚型的纯化Ig或者相同来源血清进行阻断，或者用商业化的Fc受体阻断剂。

   对于人样本， 纯化的CD16单抗可作为封闭FcR封闭剂。加1 μg纯的抗人CD16单克隆抗体（E-AB-F1236A），室温孵育10 min。
5. 按照实验设计及说明书的推荐用量加入表面荧光标记抗体，混匀，4°C避光孵育 30 min。
6. 加入至少 2 mL 细胞染色缓冲液重悬细胞，300 x g 离心 5 min，弃上清。
7. 加入 0.2 mL 细胞染色缓冲液重悬细胞，用流式细胞仪进行检测和分析。

细胞内细胞因子染色流程

1.将实验所需样本（脾脏、骨髓、淋巴结、胸腺、外周血等）制备成单细胞悬液（详情可参考Elabscience®流式样本制备指南或Elabscience®官网：www.elabscience.cn）。

** 如检测指标为细胞因子，请先对细胞进行刺激阻断培养。

- **样本刺激阻断流程：（推荐使用E-CK-A091）**

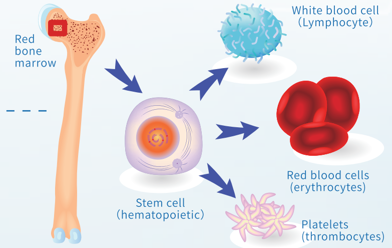
1) 用全培养基将样本制备成单细胞悬液，并调整细胞浓度为1~2×10⁶个/mL。

2) 加入Cell Stimulation MIX：每1 mL细胞悬液中，加入2 μL 的500×Cell Stimulation MIX，于37°C 5% CO_2培养箱中孵育细胞0.5~1 h。

3) 加入1000× Protein Transport Inhibitor MIX：每1 mL细胞悬液中，加入1 μL的1000× 阻断试剂，于37°C 5% CO_2培养箱中继续孵育5~16 h（根据所需检测的细胞因子设置不同的诱导时间）。

4) 收集细胞悬液，250~300 x g离心5 min，弃上清，收集细胞沉淀。

5) 用细胞染色缓冲液重悬细胞。



2. 用血球计数板或其他仪器对悬液进行计数后，调整细胞浓度至1×10^7/mL。

3. 取100 μL细胞/管（约1×10^6个细胞）于流式管内。

Elabscience®

4.（可选）根据说明书进行 Fixable Viability Dye（死活细胞鉴定染料）染色。

5.（FcR封闭，步骤可选）封闭Fc受体能减少染色过程中的非特异性染色。

对于小鼠样本，纯化的 CD16/CD32 单抗能和 FcγRIII/ II 结合，封闭非特异性染色，使阴性细胞的背景荧光降至未标记细胞的水平。加入 0.5-1 μg 纯的抗小鼠 CD16/32 单克隆抗体（E-AB-F0997A），室温孵育 10 min。

对于大鼠样本，可使用过量的与荧光抗体相同来源和亚型的纯化Ig或者相同来源血清进行阻断，或者用商业化的Fc受体阻断剂。

对于人样本，纯化的CD16单抗可作为封闭FcR封闭剂。加1 μg纯的抗人CD16单克隆抗体（E-AB-F1236A），室温孵育10 min。

6. 按照实验设计及说明书的推荐用量加入表面荧光标记抗体，混匀，4°C避光孵育30 min。

7. 孵育完成后加入2 mL细胞染色缓冲液重悬细胞，300 x g 离心5 min，弃上清。

8. 加入200 μL细胞染色缓冲液重悬细胞，加入200 μL等体积的Fixation Buffer，涡旋混匀，室温避光固定30~60min。

9. 加入1 mL 1× Permeabilization Buffer，涡旋混匀，600 x g离心5 min，弃上清。

10. 加入100 μL 1× Permeabilization Buffer重悬细胞，按照实验设计及说明书的推荐用量加入相应的胞内检测抗体，轻轻吹打混匀，室温避光孵育30 min。

11. 加入2 mL 细胞染色缓冲液，600 x g离心5 min，弃上清。

12. 加入0.2 mL细胞染色缓冲液重悬细胞，用流式细胞仪进行检测和分析。

Elabscience®

细胞核内因子染色流程

1.将实验所需样本(脾脏、骨髓、淋巴结、胸腺)制备成单细胞悬液(详情可参考Elabscience®流式样本制备指南或Elabscience®官网:www.elabscience.cn)。

2.用血球计数板或其他仪器对悬液进行计数后,调整细胞浓度至1×10^7/mL。

3.取100 μL细胞/管(约 1×10^6个细胞)于流式管内。

4.(可选)根据说明书进行 Fixable Viability Dye(死活细胞鉴定染料)染色。

5.(FcR封闭,步骤可选)封闭Fc受体能减少染色过程中的非特异性染色。

> **对于小鼠样本,** 纯化的 CD16/CD32 单抗能和 FcγRIII/ II 结合,封闭非特异性染色,使阴性细胞的背景荧光降至未标记细胞的水平。加入 0.5-1 μg 纯的抗小鼠 CD16/32 单克隆抗体(E-AB-F0997A),室温孵育 10 min。
>
> **对于大鼠样本,** 可使用过量的与荧光抗体相同来源和亚型的纯化Ig或者相同来源血清进行阻断,或者用商业化的Fc受体阻断剂。
>
> **对于人样本,** 纯化的CD16单抗可作为封闭FcR封闭剂。加1 μg纯的抗人CD16单克隆抗体(E-AB-F1236A),室温孵育10 min。

6.按照实验设计及说明书的推荐用量加入表面荧光标记抗体,混匀,4°C避光孵育30 min。

7.孵育完成后,加入1 mL细胞染色缓冲液,300x g离心5 min,弃上清,再加入100 μL细胞染色缓冲液,重悬细胞。

8.准备1 × 固定破膜液:(推荐使用E-CK-A108)

> • 1× Fixation Working Solution: 取 1 份 Fixation Concentrate (4×), 加入到 3 份 Fixation Dilution Solution 中,充分混匀。

> • 1× Permeabilization Working Solution: 取 1 份 Permeabilization Buffer (10×), 加入到 9 份去离子中, 充分混匀。

9.加入1 mL 1×Fixation Working Solution,涡旋混匀,4°C避光反应30 min;反应完成后,600 x g离心5 min,弃上清。

10.加入2 mL 1×Permeabilization Working Solution重悬细胞,600 x g离心5 min,弃上清。

11.重复步骤10。

12.加入100 μL 1×Permeabilization Working Solution重悬细胞,再加入按照实验设计及说明书的推荐用量加入相应的核内检测抗体,混匀后室温避光孵育30 min。

13.加入2 mL 1×Permeabilization Working Solution,600 x g离心5 min,弃上清。

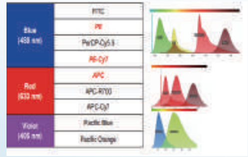
14.加入200 μL细胞染色缓冲液,重悬细胞,即可上机检测。

Elabscience®流式特色服务

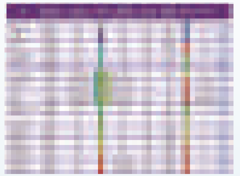
Elabscience®流式配色服务

Elabscience®为客户提供专业的免费配色服务，您只需要将您的流式实验指标（逻辑关系或参考文献、表达量高低）和流式细胞仪的基本信息（激光器、检测通道、滤光片信息）提供给我们的技术支持，我们会结合您的实验，提供专业的免费配色服务。

流式配色服务流程图



结合仪器可选通道选择备选的荧光标记物



荧光染料图谱及荧光强度查询

细胞	抗原	密度
淋巴细胞	CD3	高
	CD4	高
	CD8	中
	CD19	中
	CD132	低

抗原表达强弱查询

抗原染料合理搭配

Elabscience®

Elabscience®流式数据分析服务

对于使用Elabscience®产品的客户，也可将FCS格式原始数据、指标逻辑关系提供给技术支持，我们可以为您提供专业的免费数据分析服务。

流式数据分析服务流程图

01 客户提供基本信息

02 Elabscience®技术支持判断设计&数据的完整性

03 Elabscience®进行数据分析

04 客户收到分析结果