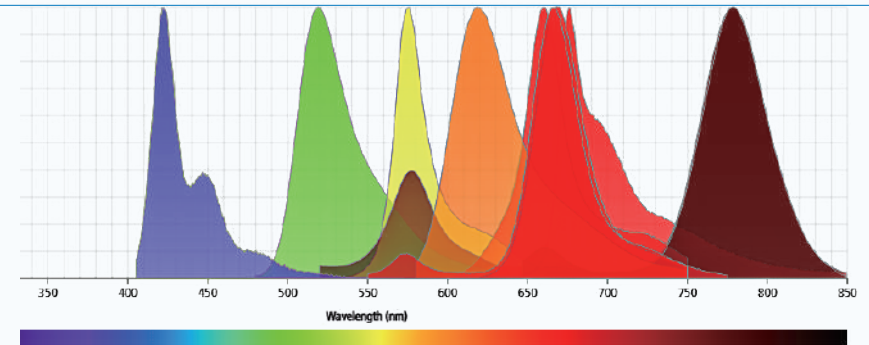


# 流式样本制备指南



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

☎ 免费技术热线: 400-9627-365

🌐 官网: [www.elabscience.cn](http://www.elabscience.cn)

☎ 电话: 027-65022280

✉ 邮箱: [marketing@elabscience.cn](mailto:marketing@elabscience.cn)

📍 地址: 武汉市高新大道858号光谷生物医药产业园二期B18栋



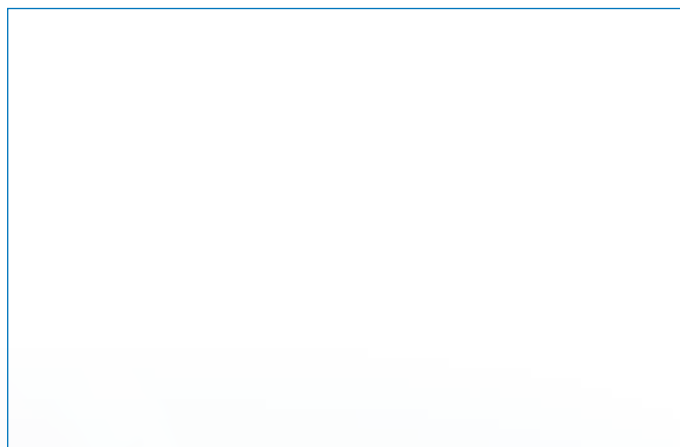
关注微信公众号



技术支持微信

# ABOUT US

## 公司介绍



### 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, 建有美国分公司和休斯敦研发中心。

主要产品为抗体、流式抗体、细胞功能检测试剂盒、ELISA试剂盒、生化试剂盒、标记试剂盒和其它相关试剂。



23 项  
已授权专利



8000<sup>+</sup> 篇  
文献引用数量



30000<sup>+</sup>  
总影响因子

# CONTENTS

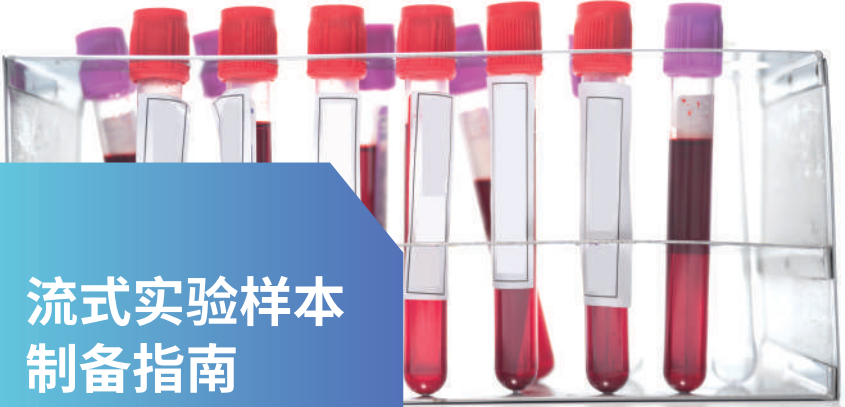
## 目录

### 流式实验样本制备指南

人外周血PBMC制备流程及注意事项	03
人外周血单细胞悬液制备及注意事项	06
小鼠外周血单细胞悬液制备流程及注意事项	11
小鼠淋巴结单细胞悬液制备及注意事项	16
小鼠脾脏单细胞悬液制备流程及注意事项	18
小鼠胸腺单细胞悬液制备流程及注意事项	20
小鼠肿瘤样本单细胞悬液的制备及注意事项	23
小鼠腹水及单细胞悬液制备及注意事项	26
小鼠骨髓单细胞悬液制备及注意事项	28

### 流式染色实验流程

细胞表面染色	30
胞浆染色	32
核内染色	33



# 流式实验样本制备指南

流式细胞术是非常让人着迷的实验——高速客观、结果稳定、具有统计学意义，能够处理复杂样本并同时获取多种参数，快速测定细胞悬液中单个细胞的生物学性质，并可以对特定的细胞进行分选收集，广泛应用于细胞生物学、免疫学、遗传学、基础医学等领域。

流式细胞术的分析检测建立在单个细胞的基础上，想要好的流式实验结果，样本必须制备成单细胞悬液，细胞团容易堵塞进样器，细胞碎片多会导致实验结果不理想，所以样本制备是流式实验里非常关键的一环。

Elabscience®的技术团队整理了常见的9种流式实验样本的制备流程及注意事项，并配以案例说明，以帮助客户更好进行流式实验，获取更好的实验结果。

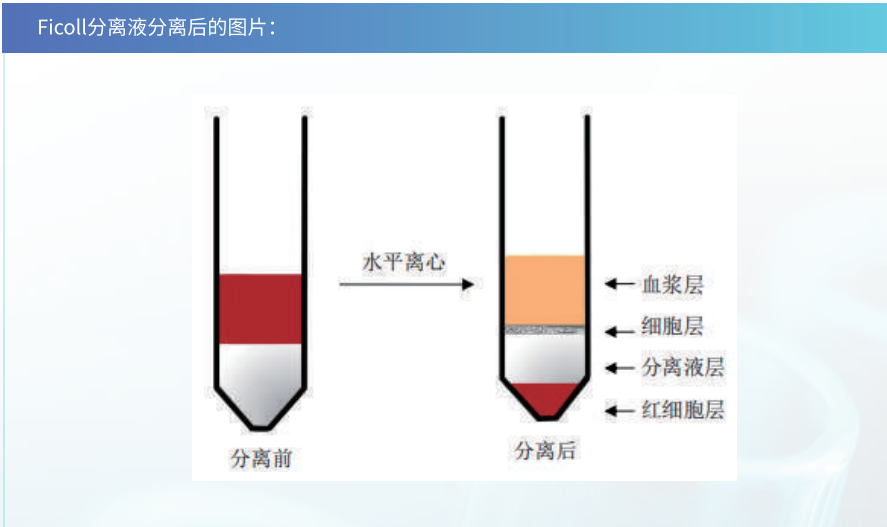
## 人外周血PBMC制备流程及注意事项

### 人外周血PBMC的制备流程

- 01 收集抗凝人外周血，用1640无血清培养基或PBS按照1:1的比例稀释。  
在10 mL离心管中，先加入3 mL充分混匀的Ficoll液（密度：1.077 g/mL），再沿着管壁缓慢加入2 mL稀释后的血液，血液和Ficoll液分层明显为成功。注：Ficoll提前半小时从4°C冰箱取出恢复到室温，温度过高会导致分离不明显，温度过低会导致密度过大，同样分离效果不好，20~25°C最佳。
- 02
- 03 将样本小心转移到离心机，500 g离心25 min。
- 04 小心取出离心管，吸取中间层的白色薄膜层，即为单个核细胞。
- 05 用10 mL PBS洗涤获得的单个核细胞，250 g离心10 min，弃上清。
- 06 重复洗涤一次。
- 07 用细胞染色缓冲液重悬细胞备用。

### 注意事项

- 1. Ficoll使用时的温度很重要，温度太高或者太低都会影响分离效果。
- 2. 血液样本最好为新鲜抗凝血（采血2 h 以内），为保持细胞活力，应避免冷冻和冷藏。
- 3. 50 mL离心管离心效率比15 mL离心管差，为了获得最大量的单核细胞，最好用15 mL离心管，且离心管使用量不要超过三分之一，可以将血样进行等分后加入多个离心管。
- 4. 分选后的细胞样本直接诱导阻断进行细胞因子的检测，效果最佳，分选后的样本也可冻存，需要的时候再诱导检测，效果和直接诱导的没有明显区别（时间保持1周以内）。
- 5. 诱导阻断后来不及检测的样本，最好冻存，并在3天内检测效果最好。冻存液推荐使用90%的FBS+10%的DMSO。冻存24h再检测，结果无大的影响；冻存3天再检测，CD3和IFN-γ表达略有降低；冻存1周后再复苏检测，CD3和IFN-γ表达较大幅度降低。
- 6. Ficoll分离液分离后的图片：



## 案例1

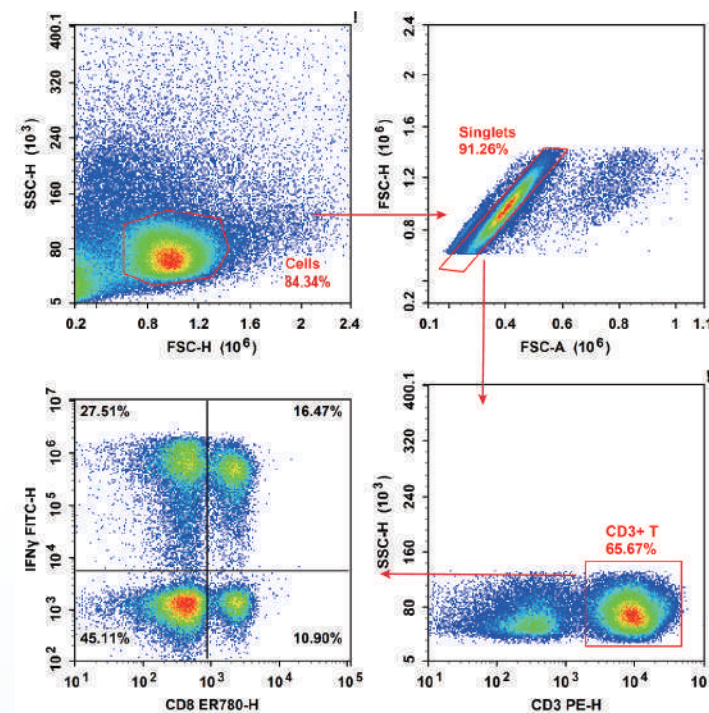
## 人外周血PBMC Th1 (3色) 检测

## Panel设置:

目的	管别	抗体搭配
调电压	空白	-
调补偿	单阳管	CD3-PE
		CD8a-ER780
		IFN- $\gamma$ -FITC
辅助划门	FMO联合同型对照	CD3-PE、CD8a-ER780、FITC Mouse IgG1, $\kappa$ Isotype Control
检测管	Full Panel	CD3-PE、CD8a-ER780、IFN- $\gamma$ -FITC

## 流式抗体信息:

指标	荧光标记	克隆号	货号
CD3	PE	UCHT1	E-AB-F1230D
CD8a	ER780	OKT-8	E-AB-F1110S
IFN- $\gamma$	FITC	B27	E-AB-F1196C
Mouse IgG1, $\kappa$ Isotype Control	FITC	MOPC-21	E-AB-F09792C



1. PMA刺激会导致人T细胞表面CD4表达的下调, 因此我们界定CD4+T细胞是通过染CD3和CD8, 其中CD3+CD8-IFN- $\gamma$ +为Th1细胞。
2. IFN- $\gamma$ 需要做同型对照, 因为一般情况下细胞因子表达量不高。
3. 破膜剂对细胞损伤较大, 建议离心后形成的细胞沉淀先用100  $\mu$ L细胞染色缓冲液重悬后再加入破膜剂, 以减少细胞损伤。

## 人外周血单细胞悬液制备流程及注意事项

### 人外周血单细胞悬液制备流程

- 01 采集人外周血样本于抗凝管中。
- 02 离心管内加入100 μL新鲜血和2 mL 1×红细胞裂解液，混匀，4°C裂解10 min。
- 03 300 g离心5 min (裂解完立即离心，防止时间过长损伤细胞)，弃上清。
- 04 PBS洗涤一次。
- 05 加入100μL细胞染色缓冲液重悬细胞，不用计数，即可进行后续流式抗体染色实验。按照100 μL新鲜血样本制备的单细胞悬液，加入1 Test对应的流式抗体混匀进行后续实验。

### ⚠️ 注意事项

- 1.采血用抗凝管，有肝素和EDTA两种。若直接裂解红细胞进行表面指标染色实验，两种抗凝管都可使用；如果是采血后检测细胞因子，则必须使用肝素抗凝。
- 2.裂解液推荐使用10× ACK Lysis Buffer (E-CK-A105)，不含固定剂。
- 3.10× ACK Lysis Buffer实验前需用纯水稀释成1×，现配现用，推荐放在4°C条件下暂存，当天使用。
- 4.检测人外周血中常规指标，可用过夜保存的样本，一般来说问题不大。但是对于表达量比较低的指标，建议用新鲜的样本检测。
- 5.第三步裂解完后离心弃上清时，建议用移液枪轻轻吸走残液。如果直接倒掉，离心管内会有残留裂解液，后续加入100 μL PBS重悬细胞时，可能不能完全稀释裂解液，导致红细胞裂解过度。
- 6.细胞沉淀重悬，可用枪轻轻吹打，或者用转速小的涡旋仪涡旋。
- 7.人血样本建议染CD45，有利于后续数据分析时圈门。
- 8.处理人血样本时，推荐设置只染CD45的单染管低速上机用来设置阈值，观察细胞量，圈淋巴细胞群。
- 9.人外周血中主要含T淋巴细胞，B淋巴细胞的量较少。如果使用病人的血液样本，B淋巴细胞的量可能更少，因此B淋巴细胞的检测不推荐使用过夜的样本，过夜样本易导致检测信号低。

### 案例2

## 人外周血Treg (6色) 检测

### Panel设置:

目的	管别	抗体搭配
调电压	空白	--
调补偿	单阳管	CD45-EV450
		CD3-ER780
		CD4-FITC
		CD8a-PerCP/Cyanine5.5
		CD25-PE
		CD127-AF647
检测管	Full Panel	CD45-EV450、CD3-ER780、CD4-FITC、CD8a-PerCP/Cyanine5.5、CD25-PE、CD127-AF647

### 流式抗体信息:

指标	荧光标记	克隆号	货号
CD45	EV450	HI30	E-AB-F1137Q
CD3	ER780	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	AF647	A019D5	E-AB-F1152M

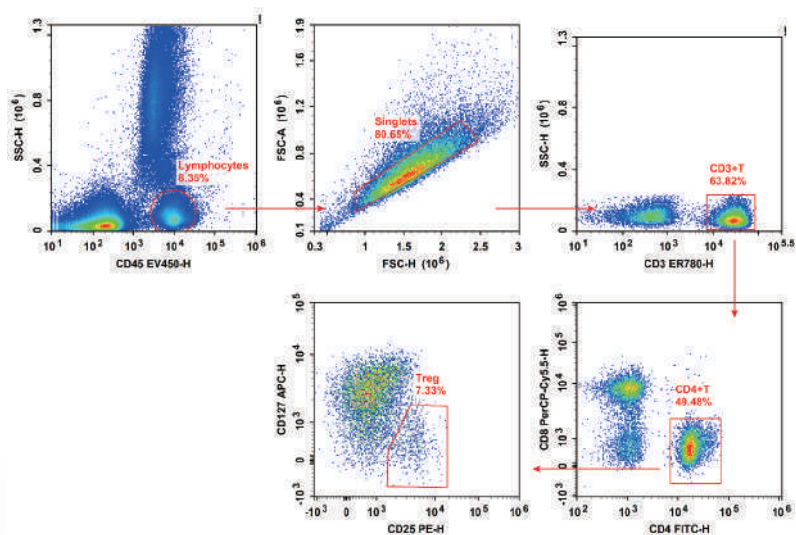
## 小鼠外周血单细胞悬液制备流程及注意事项

### 小鼠外周血单细胞悬液制备

- 01 采集小鼠外周血样本于抗凝管中。
- 02 离心管内加入100  $\mu$ L新鲜血，加入1 Test对应流式抗体，混匀，4°C避光孵育30 min。
- 03 加入2 mL 1 $\times$ 红细胞裂解液，混匀，4°C裂解5 min。
- 04 300 g离心5 min (裂解完立即离心，防止时间过长损伤细胞)，弃上清。
- 05 PBS洗涤一次。
- 06 加入200  $\mu$ L细胞染色缓冲液重悬细胞，用流式细胞仪进行检测和分析。

#### ⚠ 注意事项

- 1.采血用抗凝管，有肝素和EDTA两种，若直接裂解红细胞后进行表面指标染色，两种抗凝管都可使用；如果是采血后进行细胞因子检测，则必须使用肝素抗凝。
- 2.裂解液推荐使用10 $\times$  ACK Lysis Buffer (E-CK-A105)，不含固定剂。
- 3.10 $\times$  ACK Lysis Buffer实验前需用纯水稀释成1 $\times$ ，推荐4°C条件下暂存，当天使用。
- 4.检测小鼠外周血中常规指标，可用过夜保存的样本，一般来说问题不大，但是对于表达量比较低的指标，建议用新鲜的样本检测。
- 5.小鼠外周血中细胞量比较低，建议用先染色后裂解的方法。这种方法可以减少样本处理过程中洗涤的次数，从而降低细胞的损失，避免有些比例较低的细胞检测不到。



1.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。

2.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%。

3.需要设置单阳管用于补偿调节。



案例3

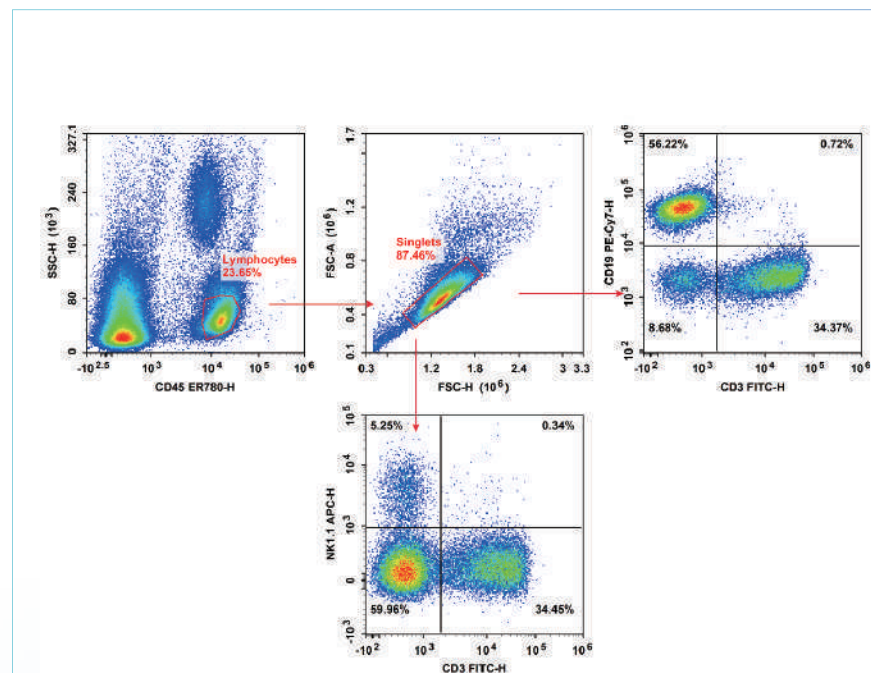
# C57小鼠外周血T/B/NK (4色) 检测

## Panel设置:

目的	管别	抗体搭配
调电压	空白	--
调补偿	单阳管	CD45-ER780
		CD3-FITC
		CD19-PE/Cyanine7
		NK1.1-APC
辅助划门	FMO联合同型对照	CD45-ER780、CD3-FITC、CD19-PE/Cyanine7、APC Mouse IgG2a, κ Isotype Control
检测管	Full Panel	CD45-ER780、CD3-FITC、CD19-PE/Cyanine7、NK1.1-APC

## 流式抗体信息:

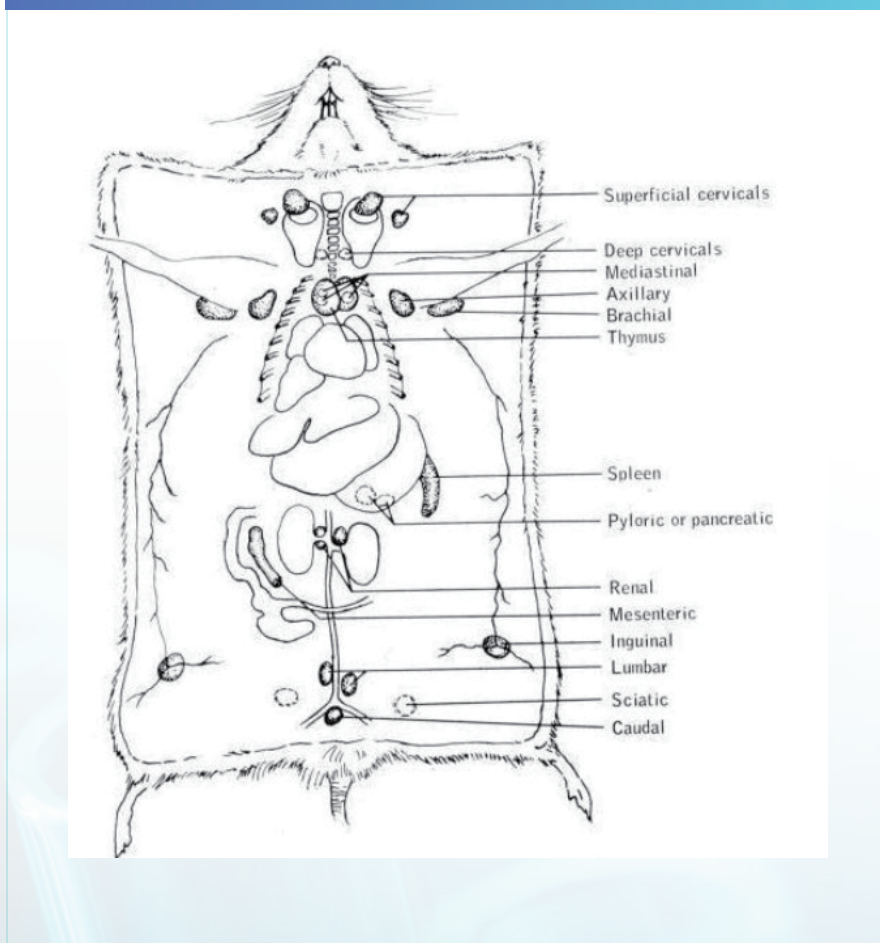
指标	荧光素	克隆号	货号
CD45	ER780	30-F11	E-AB-F1136S
CD3	FITC	17A2	E-AB-F1013C
CD19	PE/Cyanine7	1D3	E-AB-F0986H
NK1.1	APC	PK136	E-AB-F0987E
Mouse IgG2a, κ Isotype Control	APC	C1.18.4	E-AB-F09802E



- 1.外周血样本增加CD45指标, 直接通过CD45和SSC圈出淋巴细胞门。
- 2.CD3/ CD4/ CD8细胞分群明显, 即使没有同型对照, 也能很好的区分阴性细胞群。
- 3.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+。
- 4.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。

## 小鼠淋巴结单细胞悬液制备及注意事项

小鼠淋巴结分布示意图：



### 小鼠淋巴结单细胞悬液制备流程(以颈部淋巴结为例)

- 01 用颈椎脱臼法处死小鼠, 75%酒精浸泡5 min, 取出小鼠, 腹部朝上置于无菌操作台上。
- 02 用剪子从胸骨起沿正中线一直到颌下将皮肤剪开, 再从颌下向左右耳根的方向切开皮肤。用镊子夹着皮肤向左右掀开并用针固定, 即可见到胸骨上方的一对体积较大的颌下腺。在左右颌下腺各自的上缘, 附着有黄色的颈前部淋巴结。剪断胸锁乳突肌和肌腹, 并掀起它们两个断端, 可看到左颌下腺背侧深部左、右各有一个小的颈深部淋巴结。用镊子和眼科小剪仔细将淋巴结摘除。
- 03 取出淋巴结, 并浸泡于干净的PBS溶液中。
- 04 将淋巴结置于200目筛网中, 用组织研磨棒轻轻研磨。
- 05 用2 mL PBS冲洗筛网, 冲洗液收集于15 mL离心管, 300 g离心5 min, 弃上清。
- 06 用细胞染色缓冲液重悬胸腺细胞, 计数, 并调整细胞浓度至 $1 \times 10^7$ /mL。

### 小鼠淋巴结数目和长径

#### 1. 淋巴结数目：

多数部位只见一个淋巴结, 但在颈浅部、胸内部、胃部、胰部以及肠系膜部都可见到2~3个淋巴结, 也有多至4个, 其中以胸内淋巴结数目变化的情况较多。不同部位剖得淋巴结的概率是不同的。例如颈深部, 尾部或坐骨部的淋巴结难以寻找, 要求比较纯熟的解剖技术和细心的操作; 而寻找颈浅部、腋窝部或肠系膜部的淋巴结则容易成功。

#### 2. 淋巴结的长径：

绝大多数淋巴结的长径在 2 ~ 3.5 mm, 最大者为肠系膜淋巴结, 其长径都在 10 mm 以上, 最小者为颈深部, 坐骨部和尾部淋巴结, 长径皆等于或小于 1 mm。一般正常淋巴结, 其长径都不超过 4 mm。





案例4

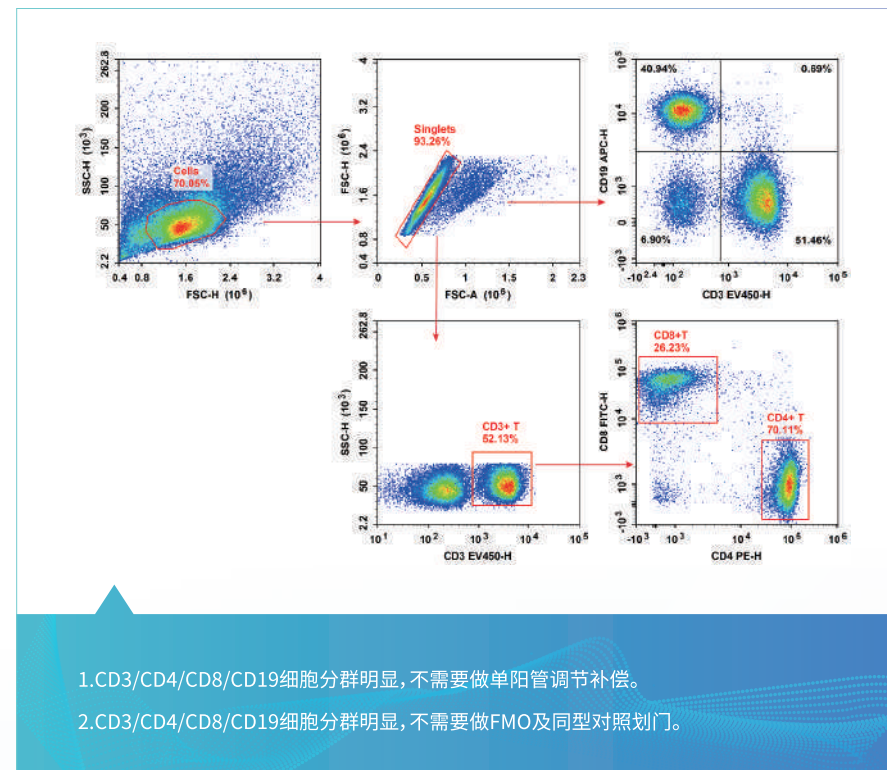
# 小鼠淋巴结T/B细胞(4色)检测

Panel设置:

目的	分组	抗体搭配
调电压	空白	--
检测管	Full Panel	CD3-EV450、CD4-PE、CD8a-FITC、CD19-APC

流式抗体信息:

指标	荧光素	克隆号	货号
CD3	EV450	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



1. CD3/CD4/CD8/CD19细胞分群明显, 不需要做单阳管调节补偿。
2. CD3/CD4/CD8/CD19细胞分群明显, 不需要做FMO及同型对照划门。

## 小鼠脾脏单细胞悬液制备及注意事项

### 小鼠脾脏单细胞悬液制备流程

a) 研磨法

- 01 用颈椎脱臼法处死小鼠, 置于75%酒精浸泡5 min后, 取出小鼠, 置于无菌操作台上, 左腹侧朝上。
- 02 小鼠左腹侧中部剪开小口, 撕开皮肤, 暴露腹壁, 可见红色长条状脾脏。
- 03 脾脏下侧提起腹膜, 剪开后上翻, 暴露出脾脏。用镊子提起脾脏, 眼科剪分离脾脏下面的结缔组织, 取出脾脏, 并浸泡于干净的PBS溶液中。

- 04 将脾脏置于200目筛网中,用组织研磨棒轻轻研磨至没有明显红色块状物。
- 05 用15 mL PBS冲洗筛网,并将冲洗液收集于15 mL离心管,300 g离心5 min,弃上清。
- 06 加入2 mL 1×红细胞裂解液重悬细胞,室温裂解2~3 min后,立刻加入10 mL PBS,300g离心5 min,弃上清。
- 07 用细胞染色缓冲液重悬脾脏细胞,将细胞悬液用200目筛网再次过滤后计数,并调整细胞浓度至 $1 \times 10^7/\text{mL}$ 。

## b)吹打法

- 01 用颈椎脱臼法处死小鼠,置于75%乙醇浸泡5 min后,取出小鼠,置于无菌操作台上,左腹侧朝上。
- 02 小鼠左腹侧中部剪开小口,撕开皮肤,暴露腹壁,可见红色长条状脾脏。
- 03 脾脏下侧提起腹膜,剪开后上翻,暴露出脾脏,用镊子提起脾脏,眼科剪分离脾脏下面的结缔组织,取出脾脏并浸泡于干净的PBS溶液中。
- 04 取无菌的2.5mL的注射器吸取PBS,左手用镊子夹持脾脏,右手持注射器,小心插入脾脏中吹打,至脾脏细胞完全被吹打干净,观察只剩余白色的结缔组织和脂肪组织为止,镊子夹取剩余的白色组织在PBS中轻轻润洗。
- 05 将吹打出的细胞用200目筛网过滤,收集于15 mL离心管,300 g离心5 min,弃上清。
- 06 加2 mL 1×红细胞裂解液重悬细胞,室温裂解2~3 min,立刻加入10 mL PBS,300 g离心5 min,弃上清。
- 07 用细胞染色缓冲液重悬脾脏细胞,计数,并调整细胞浓度至 $1 \times 10^7/\text{mL}$ 。

## ☀ 注意事项

- 1.一个正常大小的脾脏,一般情况下大约可以得到 $4 \times 10^7$ 个细胞,实际细胞数以计数结果为准。
- 2.淋巴细胞约占小鼠脾脏裂解红细胞后总细胞量的60%~70%。
- 3.未染色的脾脏细胞样本,可以在荧光通道中看到少量(大约百分之零点几)非特异性信号。
- 4.若没有组织研磨棒,也可以用注射器里面的推杆替代,用推杆前端的橡皮垫研磨脾脏。
- 5.收集的脾脏细胞如需进一步培养,取小鼠脾脏时需在有菌操作台上操作。如果只是做普通的流式实验,则可以不考虑无菌环境。
- 6.PBS可以用细胞染色缓冲液替代。
- 7.裂解红细胞这一步,裂解时间具体以实验过程中裂红的效果来判断。

## 案例5

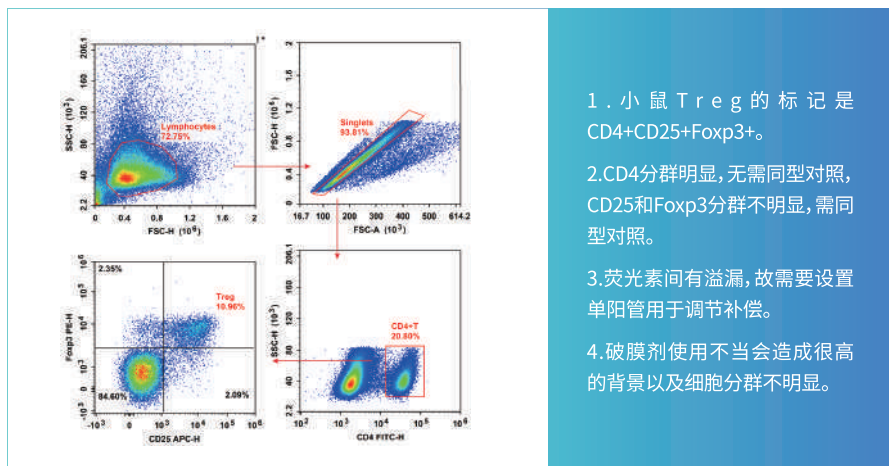
## 小鼠脾脏Treg (3色) 检测

## Panel设置:

目的	管别	抗体搭配
调电压	空白	--
调补偿	单阳管	CD4-FITC
		CD25-APC
		Foxp3-PE
辅助划门	FMO联合同型对照	CD4-FITC、Foxp3-PE、APC Rat IgG1, κ Isotype Control
		CD4-FITC、CD25-APC、PE Mouse IgG1, κ Isotype Control
检测管	Full Panel	CD4-FITC、CD25-APC、Foxp3-PE

## 流式抗体信息:

指标	荧光素	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



## 小鼠胸腺T细胞(2色)检测

案例6

### Panel设置:

目的	管别	抗体搭配
调电压	空白	--
辅助划门	FMO联合同型对照	CD4-FITC、APC Rat IgG2a, κ Isotype Control
		CD8a-APC、FITC Rat IgG2b, κ Isotype Control
检测管	Full Panel	CD4-FITC、CD8a-APC

### 流式抗体信息:

指标	荧光素	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

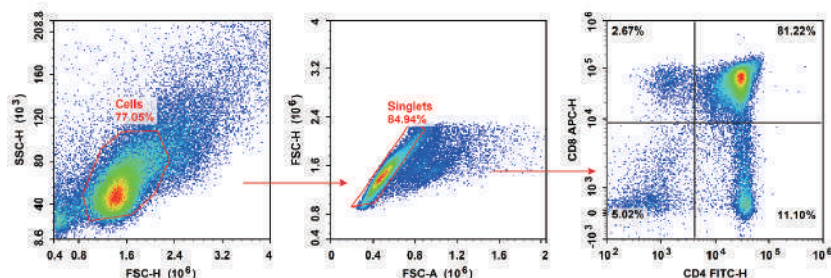
## 小鼠胸腺单细胞悬液制备流程及注意事项

### 小鼠胸腺单细胞悬液制备流程

- 01 用颈椎脱臼法处死小鼠, 75%酒精浸泡5 min后, 取出小鼠置于无菌操作台上, 腹部朝上。
- 02 小鼠胸腔下方剪开小鼠的胸腔, 可看到白色透明胸腺, 呈两叶分布, 位于两肺的前方, 胸骨的正后方。
- 03 取出胸腺并浸泡于干净的PBS溶液中。
- 04 将胸腺置于200目筛网中, 用组织研磨棒轻轻研磨至没有明显块状物。
- 05 用15 mL PBS冲洗筛网, 并将冲洗液收集于15 mL离心管, 300 g离心5 min, 弃上清。
- 06 用细胞染色缓冲液重悬胸腺细胞, 并调整细胞浓度至 $1 \times 10^7$ /mL。

### ⚠ 注意事项

- 1. 打开胸腔分离胸腺, 注意不要切断大血管及弄破心脏。
- 2. 2.3~6周龄的小鼠, 一般可获得 $2 \times 10^8$ 个细胞。随小鼠年龄增长, 胸腺细胞逐渐减少。



- 1.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+。
- 2.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。
- 3.因为FITC和APC之间没有干扰,所以该实验没有设置单阳管。

## 小鼠肿瘤样本单细胞悬液制备流程及注意事项

### 小鼠肿瘤样本制备

- 1.用颈椎脱臼法将荷瘤小鼠处死,75%酒精浸泡5 min,取出小鼠置于无菌操作台上。
- 2.左手持镊子,右手持弯剪,沿肿瘤边缘剪下长约1 cm的口子,可清晰看见肿瘤附着于皮下,沿肿瘤边缘轻轻剪开连接处,剥离肿瘤。
- 3.将剥离的肿瘤放入100 mm的培养皿中,并在室温下加入5~10 mL的1640基础培养基。

### 单细胞悬液的制备

#### 1.混合酶消化法

- 01 待所有肿瘤剥离完毕后,将肿瘤转移至1.5 mL EP管中,手持弯剪将肿瘤充分剪碎,边剪边加入1640基础培养基,静置数秒,使用1 mL移液器吸出上层较小颗粒,继续剪碎组织,重复加入1640基础培养基,直至所有的组织大小均符合要求。
- 02 将肿瘤组织悬液转移至50 mL离心管中,加入1640基础培养基,250 g离心5 min,弃上清,加入4.5 mL的1640基础培养基,重悬细胞沉淀并转移至培养皿中。
- 03 加入500  $\mu$ L的10 $\times$  Triple Enzyme stock solution 混合酶溶液,轻轻吹打至充分混匀,转移至37 $^{\circ}$ C水浴摇床消化孵育1~2 h。  
\*\* 10 $\times$  Triple Enzyme stock solution (100 mL):在80 mL的1640基础培养基中混合1 g Collagenase IV, 100 mg Hyaluronidase和20,000 Units DNase I,添加PBS至100 mL。使用0.22  $\mu$ m的滤器进行过滤,分装成5 mL储存于-20 $^{\circ}$ C冰箱,使用前恢复至室温。
- 04 消化结束后用1640基础培养基或者PBS稀释,再用200目筛网,除去残留的组织块,并使用5~10倍体积的1640基础培养基或者PBS缓冲液洗涤一次,过滤至无组织块为止,获得单细胞悬液。
- 05 收集细胞悬液,300 g离心5 min,弃上清。
- 06 用细胞染色缓冲液重悬细胞,并调整细胞浓度至 $1 \times 10^7$ /mL。

#### 2.研磨法

- 01 提前准备好200目的一次性细胞筛网,用1640基础培养基或者PBS润湿并浸泡备用(浸泡放置于6 cm细胞培养皿或者6孔板)。
- 02 将剥离的肿瘤组织转移到200目的细胞筛网,用无菌眼科剪剪成小颗粒。
- 03 取2.5 mL注射器活塞,用软头打圈方式研磨组织,研磨至筛网上无明显组织块为止,取新鲜的1640培养基或者PBS冲洗筛网2~3次。
- 04 将获得的细胞悬液用200目细胞筛网过滤。
- 05 收集细胞悬液,300 g离心5 min,弃上清。
- 06 用细胞染色缓冲液重悬细胞,并调整细胞浓度至 $1 \times 10^7$ /mL。

**☀ 注意事项**

- 1. 肿瘤体积一般不超过1000 mm<sup>3</sup>, 肿瘤质量在0.6~0.8 g之间。(若肿瘤较大下述各反应体系加倍)。
- 2. 酶消化法中用剪刀剪碎肿瘤的标准为, 其可被1 mL的枪头无阻碍地自由吸取。
- 3. 酶消化法时要避免组织消化过度, 需要每隔20 min取出观察, 无明显组织块后即结束消化; 细胞团块越小, 消化越快, 1mL移液器可以吹打的组织块, 约消化30~60 min即可完成; 若组织难以剪切, 也可以切成大小1~2 mm<sup>3</sup>左右大小, 每30 min用1 mL的移液器吹打混匀一次, 直至可以顺利通过, 约1~2 h可以充分消化。
- 4. 研磨时为尽量减少细胞损伤, 需要浸泡于培养基中研磨, 避免干磨。

**案例7**

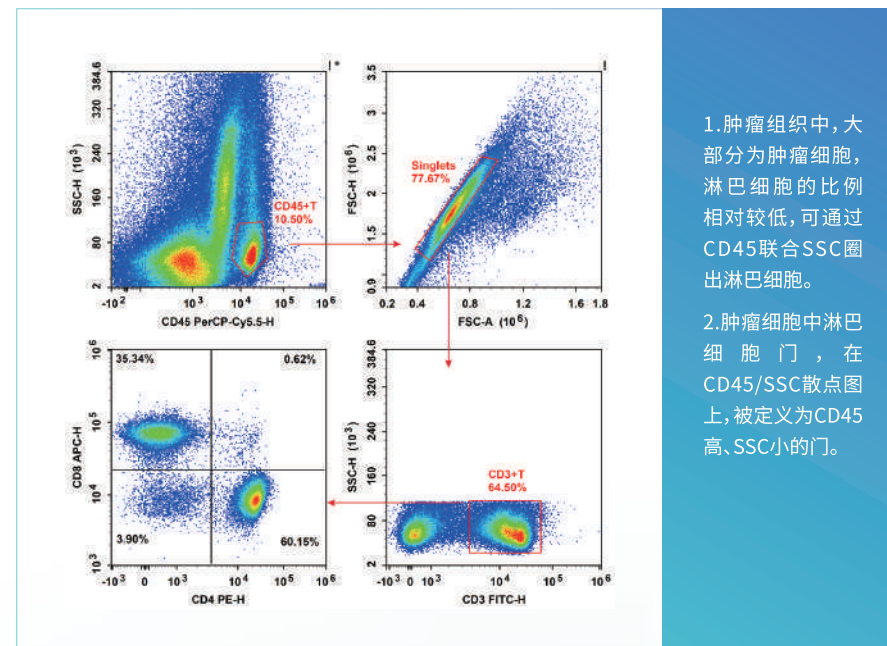
**小鼠肿瘤浸润淋巴细胞(4色)检测**

**Panel设置:**

目的	管别	抗体搭配
调电压	空白	-
调补偿	单阳管	CD45-PerCP/Cyanine5.5
		CD3-FITC
		CD4-PE
		CD8-APC
检测管	Full Panel	CD45-PerCP/Cyanine5.5、CD3-FITC、CD4-PE、CD8a-APC

**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



1. 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。

2. 肿瘤细胞中淋巴细胞门, 在CD45/SSC散点图上, 被定义为CD45高、SSC小的门。

**小鼠腹水及单细胞悬液制备及注意事项**

**小鼠腹水及单细胞悬液制备流程**

- 01 配制6%淀粉肉汤。  
6%淀粉肉汤配制方法: 牛肉膏 0.3 g、蛋白胨 1.0 g、氯化钠 0.5 g、蒸馏水 100 mL, 上述材料混合加热后加入可溶性淀粉6.0 g; 溶解后, 121°C高压灭菌15~20 min, EP管分装封口, 将肉汤放置于4°C保存。
- 02 向小鼠腹腔内注射1 mL 6%淀粉肉汤(注意避开肠管和内脏), 刺激60~72 h。
- 03 颈椎脱臼法处死小鼠, 用75%酒精浸泡小鼠5 min。
- 04 将小鼠置于解剖板中, 固定四肢, 剪开皮肤, 充分暴露腹膜。

## 案例8

## 小鼠腹腔巨噬细胞(4色)检测

- 05 用眼科镊子提起腹膜,用5 mL注射器往小鼠腹腔注射2.5 mL预冷PBS(勿扎到脏器),轻揉小鼠腹部1~2 min。注射器回抽腹腔灌洗液,收集于15 mL离心管中。
- 06 重复第5步5次,冲洗腹腔,可观察到冲洗液逐渐澄清。
- 07 将收集的腹腔灌洗液300 g离心5 min,弃上清。
- 08 用细胞染色缓冲液或者含10%胎牛血清的1640培养液重悬细胞。
- 09 进行细胞计数,并调整细胞浓度至 $1 \times 10^7$ /mL。

## 注意事项

- 1.若第7步离心弃上清后发现细胞沉淀中有较多红细胞,且检测目的细胞非红细胞,先加入适量红细胞裂解液裂解红细胞(可加入500 $\mu$ L 1 $\times$ 红细胞裂解液重悬细胞,室温裂解2min后,立刻加入10mLPBS,300 g离心5 min后弃上清)。
- 2.若提取的腹腔巨噬细胞需培养,请注意无菌操作。
- 3.收集腹水时,从小鼠左侧(肠道较多)注射PBS,从右侧(脏器较大)抽腹腔灌洗液,注意不要扎到脏器。
- 4.小鼠腹腔灌洗液收集细胞比较脆弱,加细胞染色缓冲液有利于细胞的保存,但建议当天及时检测。
- 5.小鼠腹腔灌洗液中大多数为巨噬细胞,巨噬细胞检测需要封闭Fc受体,此时可使用小鼠CD16/32纯抗[E-AB-F0997A]进行封闭:往100  $\mu$ L细胞悬液(细胞数 $1 \times 10^6$ )中加入1  $\mu$ g纯抗,室温封闭15 min,直接加入流式抗体进行后续实验。
- 6.巨噬细胞检测应尽量避免使用含花青素的流式抗体(如PE-Cy7),会增加非特异性染色。若为非巨噬细胞检测,使用含花青素的流式抗体(如PE-Cy7)时也需要封闭。

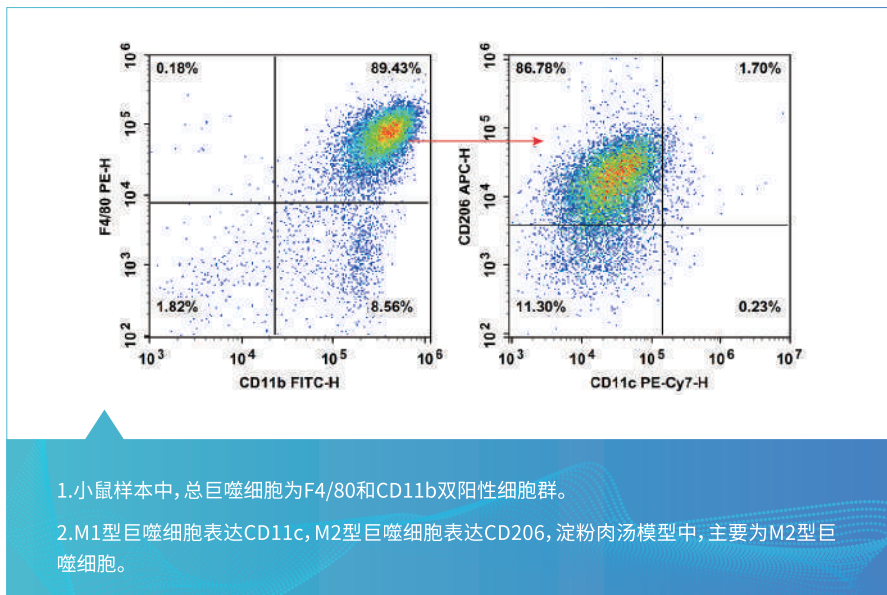


## Panel设置:

目的	管别	抗体搭配
调电压	空白	-
调补偿	单阳管	F4/80-PE
		CD11b-FITC
		CD11c-PE/Cyanine7
		CD206-APC
辅助划门	FMO联合同型对照	CD11b-FITC、CD11c-PE/Cyanine7、CD206-APC、PE Rat IgG2b, $\kappa$ Isotype Control
		F4/80-PE、CD11c-PE/Cyanine7、CD206-APC、FITC Rat IgG2b, $\kappa$ Isotype Control
		F4/80-PE、CD11b-FITC、CD206-APC、PE/Cyanine7 Armenian Hamster IgG Isotype Control
检测管	Full Panel	F4/80-PE、CD11b-FITC、CD11c-PE/Cyanine7、APC Rat IgG2a, $\kappa$ Isotype Control
		F4/80-PE、CD11b-FITC、CD11c-PE/Cyanine7、CD206-APC

## 流式抗体信息:

指标	荧光素	克隆号	货号
F4/80	PE	Cl:A3-1	E-AB-F0995D
CD11b	FITC	M1/70	E-AB-F1081C
CD11c	PE/Cyanine7	N418	E-AB-F0991H
CD206	APC	C068C2	E-AB-F1135E
Rat IgG2b, $\kappa$ Isotype Control	PE	LTF-2	E-AB-F09842D
Rat IgG2b, $\kappa$ Isotype Control	FITC	LTF-2	E-AB-F09842C
Armenian Hamster IgG Isotype Control	PE/Cyanine7	PIP	E-AB-F09852H
Rat IgG2a, $\kappa$ Isotype Control	APC	2A3	E-AB-F09832E



## 小鼠骨髓单细胞悬液制备及注意事项

### 小鼠骨髓单细胞悬液制备流程

- 01 颈椎脱臼法处死小鼠,放在75%酒精中浸泡5 min。提前于超净台上准备一个消毒托盘(可用无菌口罩或者用浸满酒精的纱布代替),取出小鼠并铺于消毒托盘上。
- 02 在无菌环境下取小鼠的后肢骨。用眼科镊小心捏起小鼠两髌关节之间的腹部皮肤,用眼科剪小心剪开,并分离两下肢的皮肤。将皮肤往下在脚踝处剪断,往上在髌关节处剪断,游离出小鼠的两条后肢。
- 03 小心剥离肌肉(肌肉两端的白色坚韧组织为肌腱,可以顺着肌腱分离。肌肉主要靠肌腱与关节相连),分别剪下Femurs(股骨)和Tibias(胫骨),剪去两端软骨,露出红色的骨髓腔。注意在该过程中应保留尽可能多的骨髓腔。
- 04 拿一支1 mL的无菌注射器,吸取1 mL PBS,轻轻插入骨髓腔,冲洗骨髓腔以获得骨髓。重复2~3次,可冲出绝大部分细胞。冲洗完后,用移液器轻轻吹打细胞,将细胞团吹散。
- 05 将冲洗液用200目的滤网过滤,滤液收集于15 mL离心管中,300 g离心5 min,弃上清。
- 06 用细胞染色缓冲液重悬细胞,细胞计数,并调整细胞浓度至 $1 \times 10^7$ /mL。

### 注意事项

- 骨髓样本细胞分群明显,可以裂解红细胞,也可不裂解。如需裂解红细胞,可以加入1~2 mL(视细胞沉淀的量而定) $1 \times$ 红细胞裂解液,轻轻吹散细胞,室温静置2 min。再加10 mL PBS终止裂解,300 g离心5 min。

### 案例9

## 小鼠骨髓巨噬细胞(5色)检测

### Panel设置:

目的	管别	抗体搭配
调电压	空白	--
调补偿	单阳管	CD45-EV450
		F4/80-PE
		CD11b-FITC
		CD11c-PE/Cyanine7
辅助划门	FMO联合同型对照	CD206-APC
		CD11b-FITC、CD11c-PE/Cyanine7、CD206-APC、PE Rat IgG2b, $\kappa$ Isotype Control
		F4/80-PE、CD11c-PE/Cyanine7、CD206-APC、FITC Rat IgG2b, $\kappa$ Isotype Control
		F4/80-PE、CD11b-FITC、CD206-APC、PE/Cyanine7 Armenian Hamster IgG Isotype Control
检测管	Full Panel	F4/80-PE、CD11b-FITC、CD11c-PE/Cyanine7、APC Rat IgG2a, $\kappa$ Isotype Control
		CD45-EV450、F4/80-PE、CD11b-FITC、CD11c-PE/Cyanine7、CD206-APC

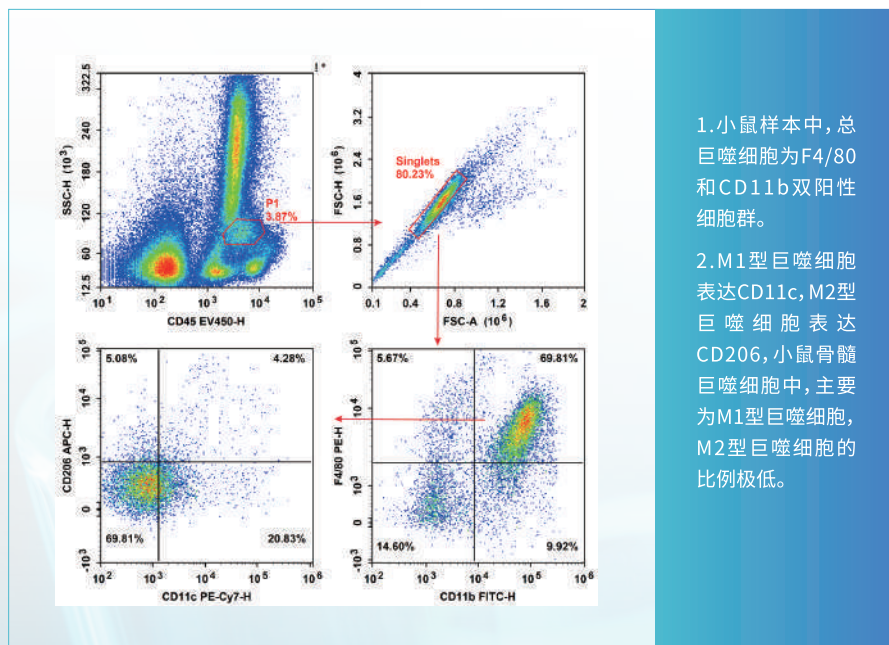
流式抗体信息:

指标	荧光素	克隆号	货号
CD45	EV450	30-F11	E-AB-F1136Q
F4/80	PE	Cl:A3-1	E-AB-F0995D
CD11b	FITC	M1/70	E-AB-F1081C
CD11c	PE/Cyanine7	N418	E-AB-F0991H
CD206	APC	C068C2	E-AB-F1135E
Rat IgG2b, κ Isotype Control	PE	LTF-2	E-AB-F09842D
Rat IgG2b, κ Isotype Control	FITC	LTF-2	E-AB-F09842C
Armenian Hamster IgG Isotype Control	PE/Cyanine7	PIP	E-AB-F09852H
Rat IgG2a, κ Isotype Control	APC	2A3	E-AB-F09832E



### 流式染色实验流程

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。



1.小鼠样本中,总巨噬细胞为F4/80和CD11b双阳性细胞群。  
 2.M1型巨噬细胞表达CD11c, M2型巨噬细胞表达CD206,小鼠骨髓巨噬细胞中,主要为M1型巨噬细胞, M2型巨噬细胞的比例极低。

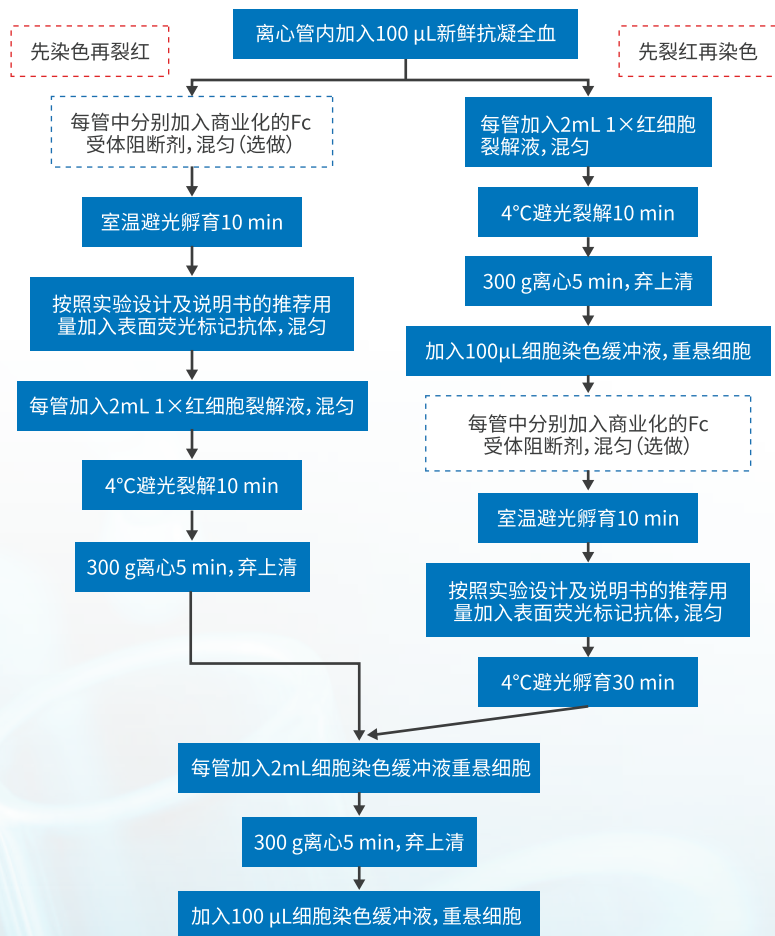
### 细胞表面染色

#### 单细胞悬液染色流程

- 01 将实验所需组织(脾脏、骨髓、淋巴结、胸腺)制备成单细胞悬液(详情可参考样本制备)。
- 02 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  $1 \times 10^7$ /mL。
- 03 取 100 μL 细胞 / 管 (约  $1 \times 10^6$  个细胞) 于流式管内。
- 04 (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。  
 ※小鼠中, 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 1 μg 纯的抗小鼠 CD16/32 单克隆抗体 (E-AB-F0997A), 室温孵育 10 min。  
 ※对于人和大鼠, 可直接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。
- 05 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。
- 06 加入至少 2 mL 细胞染色缓冲液重悬细胞, 300 g 离心 5 min, 弃上清。
- 07 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。



## 人全血染色流程



## 胞浆内指标染色

01 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(详情可参考样本制备)。

\*\* 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)

- 01 用全培养基将样本制备成单细胞悬液, 并调整细胞浓度为 $1\sim 2\times 10^6$ 个/mL
- 02 加入Cell Stimulation MIX: 每1 mL细胞悬液中, 加入2  $\mu$ L 的500 $\times$  Cell Stimulation MIX, 于37 $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub>培养箱中孵育细胞0.5~1 h。
- 03 加入1000 $\times$  Protein Transport Inhibitor MIX: 每1 mL细胞悬液中, 加入1  $\mu$ L 的1000 $\times$  阻断试剂, 于37 $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub>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)。
- 04 收集细胞悬液, 250~300 g离心5 min, 弃上清, 收集细胞沉淀。
- 04 用细胞染色缓冲液重悬细胞。

02 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 $1\times 10^7$ /mL。

03 取100  $\mu$ L细胞/管(约 $1\times 10^6$ 个细胞)于流式管内。

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

05 (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。

小鼠中, 纯化的CD16/CD32单抗能和Fc $\gamma$ RIII/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1  $\mu$ g纯的抗小鼠CD16/32单克隆抗体(E-AB-F0997A), 室温孵育10min。

对于人和大鼠, 可直接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。

06 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 $^{\circ}$ C避光孵育30 min。

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

08 加入200  $\mu$ L细胞染色缓冲液重悬细胞, 加入200  $\mu$ L等体积的Fixation Buffer, 涡旋混匀, 室温避光固定30~60 min。

09 加入1 mL Permeabilization Buffer, 涡旋混匀, 600 g离心5 min, 弃上清。

10 加入100  $\mu$ L 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细胞染色缓冲液重悬细胞, 600 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。

## 核内指标染色

01 将实验所需样本(脾脏、骨髓、淋巴结、胸腺)制备成单细胞悬液(详情可参考样本制备)。

02 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 $1 \times 10^7$ /mL。

03 取100  $\mu$ L细胞/管(约 $1 \times 10^6$ 个细胞)于流式管内。

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

05 (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。

※小鼠样本,纯化的CD16/CD32单抗能和Fc $\gamma$ RIII/ 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1  $\mu$ g纯的抗小鼠CD16/32单克隆抗体(E-AB-F0997A),室温孵育10 min。

※对于人和大鼠,可直接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。

06 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。

07 孵育完毕后,加入1 mL细胞染色缓冲液,300 g离心5 min,弃上清,再加入100  $\mu$ L细胞染色缓冲液,重悬细胞。

08 准备1  $\times$  固定破膜液:(推荐使用E-CK-A108)

※1  $\times$  Fixation Working Solution:取1份Fixation Concentrate (4 $\times$ ),加入到3份Fixation Dilution Solution中,充分混匀。

※1  $\times$  Permeabilization Working Solution:取1份Permeabilization Buffer (10 $\times$ ),加入到9份去离子水中,充分混匀。

09 加入1 mL 1  $\times$  Fixation Working Solution,涡旋混匀,4°C避光反应30 min;反应完成后,600 g离心5 min,弃上清。

10 加入2 mL 1  $\times$  Permeabilization Working Solution重悬细胞,600 g离心5 min,弃上清。

11 重复步骤10。

12 加入100  $\mu$ L 1  $\times$  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。

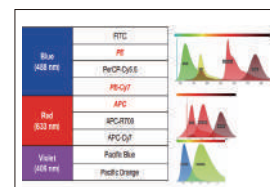
13 加入2 mL 1  $\times$  Permeabilization Working Solution,600 g离心5 min,弃上清。

14 加入200  $\mu$ L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®专业的流式配色服务

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,我们将会结合您的实验,提供专业的免费配色服务。



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



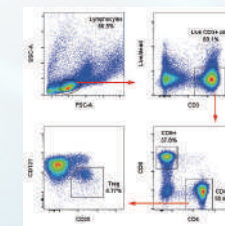
抗原染料合理搭配

### Elabscience®专业的流式数据分析服务

使用Elabscience®产品的客户,也可将FSC格式原始数据、指标逻辑关系等,提供给技术支持,我们可以为您提供专业的数据分析。



数据分析流程



Elabscience®流式数据分析结果展示