Flow Cytometry 标准操作流程

1. 目的

特定波长的激光束直接照射到高压驱动的液流内的细胞，产生的光信号被多个接收器接收，一个是在激光速直线方向上接收到的散色光信号，一个是在激光束垂直方向上接收到的光信号，包括散射光信号（侧向角散射）和荧光信号。散射光信号和荧光信号被相应的接收器接收，根据接收到的信号的强弱波动就能反映出每个细胞的理化学特征。

2. 适用范围

单细胞悬液或生物颗粒分析

3. 程序

3.1 实验仪器

分析型流式细胞仪

3.2 实验材料和试剂

不同规格移液器、吸头、96 孔细胞培养板、避光用锡箔纸、NBS、一抗、荧光二抗、BSA、1xPBS。

洗涤液/抗体稀释液：即 0.2%BSA，0.2g BSA 加到 100ml PBS 中，混匀，现配现用。

3.3 实验步骤

3.3.1 细胞准备

一个流式反应常常需要准备约 0.2~1*10^6 个细胞，根据实验需要提前准备好细胞。

3.3.2 实验方法

（1）细胞处理：对于无血清培养的悬浮细胞，直接收集细胞至离心管中（贴壁细胞用胰酶消化成单个细胞后收集到离心管中），1500rpm 离心 5min，弃去培养基，用 PBS 洗细胞 2 次，1500rmp 离心 5min。对于有血清培养的悬浮细胞，直接收集细胞至离心管中，1500rpm 离心 5min，弃去培养基，用一定体积 0.2%BSA 重悬细胞，1500rmp 离心 5min，去除上清后直接进行第 4 步反应

（2）封闭：加入 PBS 重悬细胞，加入 5%体积的 NBS 封闭细胞，混匀后室温孵育 15min，1500rmp 离心 5min，去掉上清。

（3）洗涤：用 0.2%BSA 重悬细胞 1 次，1500rmp 离心 5min，去除上清。

DIMA BIOTECH

（4）细胞铺板：向细胞沉淀加入一定体积的 0.2%BSA 重悬细胞，将细胞悬液分装到 96 孔板对应孔中，每孔 50ul 细胞悬液；

（5）一抗反应：将抗体按照需要进行稀释，加入到对应细胞孔中，每孔加入 50ul 抗体稀释液，震荡重悬细胞，冰上孵育 30min。

（6）洗涤：孔板 2390rpm 离心 3min ，轻甩去上清，每孔加入 200ul 0.2%BSA， 2390rmp 离心 3min，轻甩去上清。

（7）二抗反应：将二抗按照流式使用推荐浓度进行稀释，将二抗稀释液加入到对应孔中，每孔加入 50ul ，震荡重悬混匀细胞，冰上避光反应 30min。

（8）洗涤：孔板 2390rpm 离心 3min ，轻甩去上清，每孔加入 200ul 0.2%BSA， 2390rmp 离心 3min，轻甩去上清，最后用 200ul 0.2%BSA 重悬细胞。

（9）根据标记抗体的荧光素选择正确的激发光并上机测试。

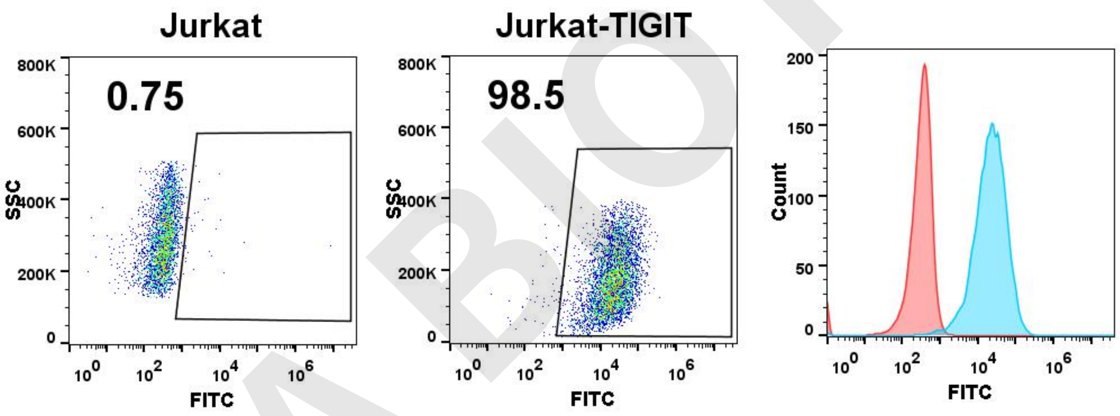

图 1 Flow 结果分析示范

Flow cytometry analysis with Anti-TIGIT on Jurkat cell lines transfected with human TIGIT (Blue histogram) or Jurkat cells (Red histogram).