

**流式抗体染色实验**

**检测结题报告**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **客户姓名** |  | **订单编号** |  |
| **项目启动日期** |  | **项目完成日期** |  |
| **报告撰写人** |  | **报告复核人** |  |
| **报告授权人** |  | **报告生效日期** |  |

尊敬的客户：

您好！

**成都奥创生物科技有限公司**是联合多家高校、科研院所发起，由一批基础生物学、生物医药、临床医学领域杰出的科学家带队组成。主营业务包括整体课题项目服务实验（分子、蛋白、细胞、动物、病理等），全方位生物、医学研究技术服务和科研设计咨询、生物医药企业CRO外包服务等。

**成都奥创生物**联合多位来自于了中山大学、四川农业大学、华中农业大学、四川大学、中科院等著名高校以及研究机构的专家学者担任企业顾问，其中专业覆盖肿瘤学、蛋白免疫学、分子生物学、细胞生物学、形态学等诸多领域，并与国内相关领域的专家以项目合作的方式联合开展转化医学研究，组成了一个优势交叉互补、高度专业的科研团队，负责研发课题的具体实施和推进，确保各项目的高效与质量。致力于实验科研平台互联，资源共享。借助此平台为广大科研院校，生物医药企业及个人提供分子、蛋白、细胞、病理等研究技术服务。

1. **整体项目平台**

能为广大客户提供从课题咨询，课题设计，项目实施到论文撰写，润色，发表等一站 式整体课题外包服务，强大的科研团队，全面的技术平台和完善的管理体系，让您的课题进展更加高效。

1. **核酸研究平台**

服务项目：核酸抽提，常规PCR，荧光定量PCR，微滴式数字PCR，载体构建，甲基化检测等。

1. **蛋白与免疫平台**

服务项目：Western blot，COIP,无标记分子互作检测，ELISA，多因子蛋白悬液芯片检测，蛋白表达纯化，蛋白质谱等。

1. **细胞研究平台**

服务项目：细胞周期，细胞凋亡，细胞增殖，CBA多因子检测，细胞共培养及趋化，细胞迁移及侵袭，细胞粘附检测，流式细胞检测，稳转细胞系构建，细胞单克隆形成检测，双荧光素酶检测，显微拍照检测等。

1. **病毒包装平台**

服务项目：慢病毒包装，逆转录病毒包装，腺病毒包装，腺相关病毒包装等。

1. **病理染色**

服务项目：各类切片及染色服务，免疫荧光，免疫组化,TUNEL，原位杂交染色,组织芯片，全景扫描等。

1. **动物模型平台：**

服务项目：常见疾病动物模型及肿瘤模型构建，动物饲养，取材，手术。

**我们的服务承诺：** █ 唯一 █ 真实 █ 专业 █ 效率

欢迎科研院所、医院、生物医药企业的广大用户来我公司进行科研项目订制，我们将为您提供专业高效的一站式科研服务。

## 声明

为保证独立、客观、公正地从事检验检测工作，提高服务质量。现以奥创生物名义，向社会各界和客户作如下声明，并接受有关单位和客户的监督。

1、遵守国家的各项法律、法规、政策，严格执行有关标准，规范及细则等技术文件开展检测工作，以诚实、公正的态度确保检测工作质量，并对检测结果负责。

2、公司具有固定的工作和检验检测场所，拥有与开展的检测工作相匹配的专业技术、管理人员，拥有相关检测所需的设备设施。

3、承诺对客户的技术、资料、数据和其他商业机密严格保密，切实维护客户的权益，绝不利用客户的技术和资料从事技术开发和技术服务。

4、承诺对所有委托方一视同仁，提供相同的优质、高效服务，保证检测数据和结果的真实、客观、准确。

5、承诺出具的检验检测数据、结果独立于所涉及的利益相关方，不受任何可能干扰其技术判断因素的影响，确保检验检测数据、结果的真实、客观、准确。

以上声明，本公司全体人员必须严格遵守。

成都奥创生物科技有限公司

目录

[声明 4](#_Toc169254413)

[一、实验仪器 6](#_Toc169254414)

[二、 试剂与耗材 6](#_Toc169254415)

[三、实验步骤 7](#_Toc169254416)

[（一）样本前处理 7](#_Toc169254417)

[1、组织 7](#_Toc169254418)

[2、全血 7](#_Toc169254419)

[3、 细胞 7](#_Toc169254420)

[4、 体液 8](#_Toc169254421)

[（二） 样本分组 8](#_Toc169254422)

[（三）染色 8](#_Toc169254423)

[1、FVS染色（选做） 8](#_Toc169254424)

[2、FC阻断 8](#_Toc169254425)

[3、表抗染色 8](#_Toc169254426)

[4、固定破膜+胞内染色 9](#_Toc169254427)

[5、同型对照（选做） 9](#_Toc169254428)

[6、FMO（选做） 9](#_Toc169254429)

[四、实验结果 9](#_Toc169254430)

# 一、实验仪器

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **实验仪器** | **品牌** | **货号** |
| 二氧化碳培养箱 | LABGIC | COI-80 |
| 流式细胞仪 | 层浪 | FongCy C2080 |
| 净化工作台 | 尚光 | 1FD |
| 高速微量冷冻离心机 | SciloEGX | CF1524R |
| 高速大容量冷冻离心机 | LABGIC | L-CM-4019 |
| 涡旋混合器 | 塞维尔 | MV-100 |
| 手动移液枪 | Thermo | / |

# 试剂与耗材

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **试剂名称** | **品牌** | **货号** |
| purified Anti-Human CD16 Antibody | Elabscience | E-AB-F1236A |
| Purified Anti-Mouse CD16/32 Antibody | Elabscience | E-AB-F1236A |
| 胞内因子固定破膜剂 | Elabscience | E-CK-A109 |
| 红细胞裂解液 | solarbio | R1010 |
| 7-氨基放线菌素D(7-AAD)染色液 | Elabscience | E-CK-A162 |
| Annexin V | Elabscience | E-CK-A111 |
| Annexin V Binding Buffer(10×) | Elabscience | E-CK-A151 |
| 磷酸盐缓冲液（PBS） | Biosharp | BL316A |
| 血球计数板 | Marienfeld | 650030 |
| 70um白色细胞滤网 | Biosharp | BS-70-XBS |
| 胶头滴管 | Biosharp | BS-XG-03L |
| 5ml医用注射器带针 | 赣发 | 20230619 |
| 胰蛋白酶（Trypsin） | Biosharp | BL526A |
| 离心管 | LABSELECT | / |

# 三、实验步骤

## 样本前处理

### 组织

**（脾脏组织）**

1、将组织放在滤网中，研磨组织同时加PBS，直到组织全部研磨完毕。

2、将研磨的50 mL离心管中的组织悬液4℃ 离心5 min。

3、弃上清，向沉淀加入3 mL红细胞裂解液并吹打重悬沉淀，裂解沉淀1 min。

4、向红细胞裂解液重悬的沉淀加30 mL PBS，混匀，终止裂红，4℃离心5 min

5、弃上清，1 mL PBS重悬，取10 μL细胞悬液测浓度。

**（其他组织）**

1、如肺脏、肝脏、和肿瘤组织内含有较多的结缔组织，研磨无法得到理想单细胞悬液，因此需要在培养皿中，将脏器剪后加入IV型胶原酶（500μg/ml）脱氧核糖核酸酶I（0.3mg/ml）3-5ml，转移至15ml离心管，尽量剪碎以增加组织与酶的接触面积，在37℃水浴下消化，间隔20-30分钟摇晃一次。肺脏较韧，通常消化2-3h；

2、取70 μm滤网放在50 mL离心管上，用预冷PBS润洗滤网；

3、组织消化完成后，可肉眼看出组织碎片缩小，取出消化后的悬液与剩余组织碎片，转移至滤网中，用注射剂活塞按一个方向研磨组织同时加PBS，直到组织全部研磨完毕，研磨完成后用PBS冲洗滤网；

4、将研磨到50 mL离心管中的组织悬液4℃ 300 g 离心5 min；

5、弃上清，若有明显的红细胞沉淀则加红细胞裂解液，向沉淀加入3mL红细胞裂解液并吹打重悬沉淀，裂解沉淀1 min。

6、向红细胞裂解液重悬的沉淀加30 mL PBS，混匀，终止裂红，4℃ 400 g 离心5 min

7、弃上清，1 mL PBS重悬，取10 μL细胞悬液测浓度，保证所有样本的体积浓度在1\*105-1\*106个/ml。

### 2、全血

1、取100μL抗凝血，4℃，离心5min，离心弃上清。加入1 ml红细胞裂解液，轻轻吹打混匀，裂解1 min。

2、4℃，离心5 min，弃红色上清。预冷PBS重悬细胞，4℃，离心2 min。再次加入1 ml红细胞裂解液，混匀，裂解1 min。4℃，5 min，弃红色上清。

3、1 mL预冷PBS重悬细胞，4℃，离心2 min。

4、500 μL预冷的PBS重悬细胞，取10 μL细胞悬液测浓度。

### 细胞

贴壁细胞

1、去掉孔板中的培养基，加入 PBS清洗细胞5 min后，去掉PBS。

2、向孔板加入500 μL不含EDTA的胰酶，将孔板置于37℃消化细胞。

3、吹下贴壁的细胞，将细胞悬液转至离心管中，1200 rpm离心5 min。

去掉上清， PBS重悬沉淀即为单细胞悬液

悬浮细胞

1、吹打混匀孔板中的细胞，转移至离心管中，1200 rpm离心5 min。

2、去掉上清，用PBS重悬沉淀即为单细胞悬液，取10 μL细胞悬液测浓度。

度。

### 体液

需在冰上操作。将腹水收集后，3000rpm离心10min后取沉淀，（若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，需要先加入适量红细胞裂解液裂解红细胞。）1 mL预冷PBS重悬细胞，4℃，400 g离心2 min。500 μL预冷的PBS重悬细胞，取10 μL细胞悬液测浓度。然后至低温保存

## 样本分组

1. 空白管：即不添加任何荧光染色的对照管。
2. 同型对照管：（由于不同的一抗同型抗体不一样，单独订购每支同型对照抗体成本较高，一般用封闭专用抗体来消除FC受体影响，而不做同型对照）即用待测样本染了荧光抗体同型对照的对照管。
3. 单染管：即染了一种荧光素的对照管。
4. 全染管：即需染多种荧光素的实验组样本
5. FMO：也叫荧光减一对照，即在同时染多种荧光时，除了某一荧光外其他的荧光同时染色。

## （三）染色

**下面的染色步骤均针对上述试剂，若更换其他试剂厂商或货号，请参考该试剂说明书**

### 1、FVS染色（选做）

1、细胞按照实验方案进行凋亡诱导，300 g离心5 min，弃上清，收集细胞，PBS洗涤一次后，轻轻重悬细胞并计数。

2、取1~5 × 105重悬的细胞，300 g离心5 min，弃上清。用PBS洗涤细胞一次，离心后弃上清，加入500 μL稀释的1 × Annexin V Binding Buffer重悬细胞。

3、细胞悬液中加入5 μL的Annexin V- 荧光染色液和5 μL的7-AAD Reagent (100μg/mL) 。涡旋混匀后，室温避光孵育15~20 min

4、反应完成后立即上机检测。如不能及时检测，请于冰上避光静置并于1小时内完成检测。

### 2、FC阻断

1200 rpm离心5min，弃上清，每管加入100 μL流式染色缓冲液重悬，人源样本每管加入1 μL purified Anti-Human CD16 Antibody；小鼠来源样本每管加入2 μL Purified Anti-Mouse CD16/32 Antibody室温避光阻断15min。

### 表抗染色

根据抗体货号查询相应流式抗体的工作浓度，（若上一步骤为加入FC避光阻断15min，则无须离心重悬，若是无任何操作的细胞悬液则离心去上清加入100ul上样缓冲液）取各表面染色抗体对应体积加入到对应样本管中，重悬细胞，室温避光孵育15 min。若无胞内染色，表面染色结束后，离心去上清，加入200ul上样缓冲液即可上机，若需染胞内抗体则看下续操作。

### 4、固定破膜+胞内染色

1、需使用胞内因子固定破膜剂

试剂配置：试剂盒中 Permeabilization Buffer (5×)为 5×浓缩液，实验前用去离子水稀释成1×Permeabilization Working Solution。

2、样本管的表面抗体孵育完成后加入 1 mLPBS（含 1% BSA）或上样缓冲液重悬细胞，将需要破膜操作的样本管一同300×g 离心5min，弃上清

3、加入 200 µL PBS（含 1% BSA）或 上样缓冲液悬细胞，然后加入 200 µLFixation Buffer 于室温避光孵育 30~60 min（室温低于 25°C 时请适当延长孵育时间到 60 min）。

4、加入 1 mL 1×Permeabilization Working Solution，600×g 离心 5min，弃上清。

5、加入 100 µL 1×Permeabilization Working Solution 重悬细胞，按照抗体查询，加入相应的胞内染色抗体，混匀后室温避光孵育 30 min。加入 2 mL PBS（含 1% BSA）或上样缓冲液，重悬细胞。

6、600×g 离心 5 min，弃上清。加入适量200μl上样缓冲液重悬细胞，即可上机检测。

### 5、同型对照（选做）

由于不同的一抗同型抗体不一样，需单独订购每支同型对照抗体

1. 需单独准备与抗体数对应的同型对照管，根据抗体货号查询相应同型对照抗体的工作浓度、是否胞内染色
2. FC封闭后，加入同型对照抗体工作浓度，若需胞内染色则与4中固定破膜+胞内染色操作一致
3. 其余步骤根据抗体染色选择设置单染管或者是否胞内染色。

### FMO（选做）

1、也叫荧光减一对照，即在同时染多种荧光时，除了某一荧光外其他的荧光同时染色。

2、如有ABC三支抗体染色，则FMO(A)加入B+C抗体、FMO(B)加入A+C抗体、FMO(C)加入A+B抗体。

3、FC封闭后，加入各对应抗体工作浓度，若需胞内染色则与4中固定破膜+胞内染色操作一致

1. 其余步骤根据抗体染色选择设置单染管或者是否胞内染色。

# 四、实验结果