

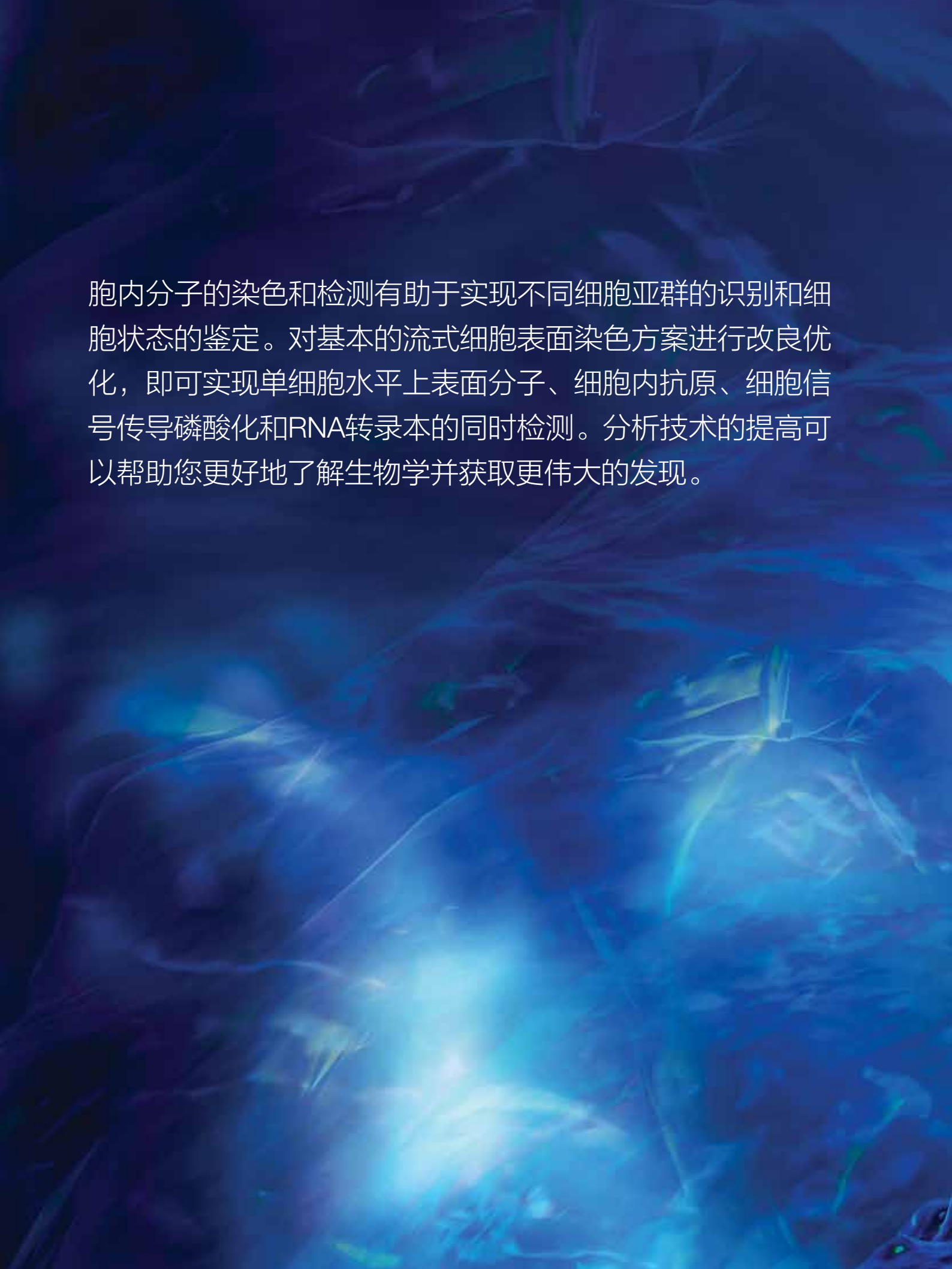
invitrogen



流式胞内分析

从不同角度了解细胞

ThermoFisher
SCIENTIFIC



胞内分子的染色和检测有助于实现不同细胞亚群的识别和细胞状态的鉴定。对基本的流式细胞表面染色方案进行改良优化，即可实现单细胞水平上表面分子、细胞内抗原、细胞信号传导磷酸化和RNA转录本的同时检测。分析技术的提高可以帮助您更好地了解生物学并获取更伟大的发现。

目录

胞内染色	4
细胞因子抗体	6
趋化因子抗体	9
效应分子抗体	10
其他胞浆抗体	11
<hr/>	
核内染色和转录因子抗体介绍	12
<hr/>	
胞内染色缓冲液的选择	15
<hr/>	
固定破膜处理后不同抗体克隆染色效果	16
<hr/>	
特异性磷酸化蛋白的流式分析	17
<hr/>	
流式分析基因表达	20
<hr/>	
细胞内抗体染色方案	22
方案A: 胞浆蛋白染色	22
方案B: 核蛋白染色	23
方案C: 固定/甲醇	25
<hr/>	

胞内染色

流式细胞分析的胞内蛋白染色的步骤和缓冲液不同于传统的细胞表面抗体染色。细胞需要先固定，以便稳定细胞膜和交联蛋白质，接着是破膜处理，让抗体进到细胞内结合胞内抗原。Invitrogen™ eBioscience™细胞内固定和破膜缓冲液可实现胞浆蛋白及细胞器或囊泡中分泌蛋白的最佳染色结果。

适当的刺激条件和蛋白生成的动力学取决于细胞类型和待分析的蛋白质，静息细胞中的分泌蛋白(如细胞因子和趋化因子)的表达水平一般较低。蛋白表达必须经过诱导和分泌阻断才能通过流式细胞仪检测到。尽管PMA (12-豆蔻酸-13-乙酸佛波醇)和离子霉素(钙离子载体)常结合用于诱导细胞因子生成，但对于更特异的刺激或特定细胞的活化，靶向细胞受体(如用于T淋巴细胞的CD3和CD28)的功能抗体是一个非常不错的选择。

通常需要阻断表达蛋白的分泌通路，以实现目的蛋白的积聚。常用的是brefeldin A，它可以阻断蛋白质在内质网内的转运；或使用莫能菌素阻断其在高尔基体内的转运。Invitrogen™ eBioscience™细胞刺激混合物包含刺激剂PMA和离子霉素，带或不带蛋白转运(分泌通路)抑制剂，都采用即用式包装。

我们提供了各种高质量的Invitrogen™ eBioscience™抗体用于检测和分析，有多种染料可供选择。

如需了解有关细胞因子刺激方案的更多详情，请参见第6和7页。

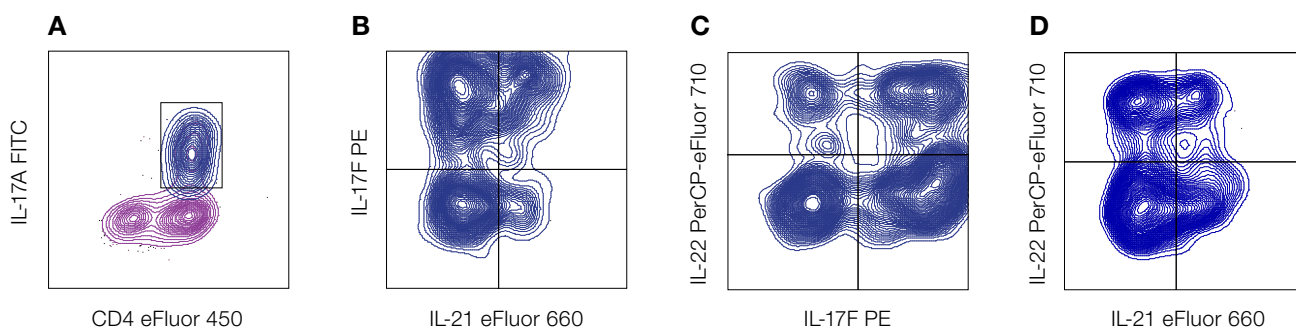


图1. 人CD4⁺ T细胞中的Th17细胞因子染色。利用细胞刺激混合液(带蛋白转运抑制剂)(货号: 00-4975)刺激Th17极化的CD4⁺ PBMC 5小时，然后利用Invitrogen™ eBioscience™人Th17细胞因子染色抗体(货号: 88-8419)进行细胞内染色。通过Invitrogen™ eBioscience™ (A) CD4 eFluor™ 450 (货号: 48-0049)和IL-17A FITC (货号: 11-7179)抗体染色对淋巴细胞设门，随后利用Invitrogen™ eBioscience™ (B) IL-21 eFluor™ 660 (货号: 50-7219)、(C) IL-17F PE (货号: 12-7169)和(D) IL-22 PerCP-eFluor™ 710 (货号: 46-7229)抗体染色分析。

表1. 即用型细胞刺激剂和转运抑制剂。

说明	货号
Cell Stimulation Cocktail (500X)	00-4970
Cell Stimulation Cocktail (plus protein transport inhibitors) (500X)	00-4975
Protein Transport Inhibitor Cocktail (500X)	00-4980
Brefeldin A Solution (1,000X)	00-4506
Monensin Solution (1,000X)	00-4505
Concanavalin A (Con A) Solution (500X)	00-4978
Lipopolysaccharide (LPS) Solution (500X)	00-4976
Phytohemagglutinin-L (PHA-L) Solution (500X)	00-4977
Anti-Human CD3 Functional Grade Monoclonal Antibody (clone OKT3)	16-0037
Anti-Human CD28 Functional Grade Monoclonal Antibody (clone CD28.2)	16-0289
Anti-Mouse CD3e Functional Grade Monoclonal Antibody (clone 145-2C11)	16-0031
Anti-Mouse CD28 Functional Grade Monoclonal Antibody (clone 37.51)	16-0281

细胞因子抗体

表2. Invitrogen™ eBioscience™细胞因子抗体。

小鼠																			
抗原	克隆	货号	纯化	功能级	生物素	紫色激光	蓝色激光				绿色、黄绿色激光					红色激光			
						eFluor™ 450	FITC or Alexa Fluor™ 488	PerCP-Cyanine5.5	PerCP-eFluor™ 710	PE	PE-eFluor™ 610	PE-Cyanine5	PE-Cyanine5.5	PE-Cyanine7	Alexa Fluor™ 532	APC or eFluor™ 660	Alexa Fluor™ 700	APC-eFluor™ 780	
G-CSF	9B4CSF	7353		■													■		
GM-CSF	MP1-22E9	7331	■	■			■										■		
IFN γ	XMG1.2	7311	■	■	■	■	■	■									■		
IL-1 α	ALF-161	7011	■	■			■										■		
IL-1 β pro-form	NJTEN3	7114				■	■		■								■		■
IL-2	JES6-5H4	7021	■	■	■	■	■	■									■		
IL-4	11B11	7041	■	■			■		■								■		
IL-5	TRFK5	7052	■	■			■										■		
IL-6	MP5-20F3	7061	■	■		■	■		■								■		
IL-9	RM9A4	8091															■		
IL-10	JES5-16E3	7101	■	■			■	■									■	■	
IL-12 p35	4D10p35	7352															■		
IL-12/IL-23 p40	C17.8	7123		■	■	■	■	■									■		
IL-13	eBio13A	7133	■	■		■	■		■		■						■		
IL-17A	eBioMM17F3	7173		■													■		
IL-17AF	B8KN8R	9171															■		
IL-17F	eBio18F10	7471					■		■								■		
IL-21	mhalx21	7213															■		
IL-22	1H8PWSR	7221							■								■		
IL-23 p19	fc23cpg	7023					■		■								■		
IL-27 p28	MM27-7B1	7285		■					■								■		
LAP	TW7-16B4	9821							■								■		
TL1A	Tandys1a	7911							■								■		
TNF α	MP6-XT22	7321	■	■		■	■		■								■		
人																			
G-CSF	8F5CSF	7351															■		
GM-CSF	GM2F3	7356															■		
IFN γ	4S.B3	7319	■		■	■	■	■									■	■	■
IL-1 α	364/3B3-14	7118	■				■										■		
IL-1 β	CRM56	7018	■	■			■										■		
IL-1RA	CRM17	7015					■										■		
IL-2	MQ1-17H12	7029	■			■	■		■		■						■		
IL-4	MP4-25D2	7048	■	■	■												■		
IL-5	TRFK5	7052	■	■			■										■		
IL-6	MQ2-13A5	7069	■	■		■	■		■								■	■	
IL-8 (CXCL8)	8CH	8088				■	■		■								■		
IL-9	MH9A4	7097				■	■										■		
IL-10	JES3-9D7	7108	■	■		■	■										■		
IL-12 p35	SNKY35	7359															■		
IL-12/IL-23 p40	C8.6	7129	■	■	■	■	■										■		
IL-13	85BRD	7136					■										■		
IL-17A	eBio64CAP17	7178	■	■													■		
IL-17AF	20LJS09	9179				■	■										■		
IL-17F	SHLR17	7169		■					■								■		
IL-17FF	WU24A4P	9178							■								■		
IL-21	eBio3A3-N2	7219	■														■		
IL-22	22URT1	7229				■	■		■								■		
IL-23 p19	eBio473P19	7238	■														■		
IL-27 EB13 subunit	ebic6	7358							■								■		
IL-27 p28	3D1p28	8277															■		
IL-31	31SNEZE	9319															■		
LAP	FNLAP	9829				■			■								■		
TL1A	Tandys1a	7911							■								■		
TNF α	MAB11	7349	■		■	■	■		■								■	■	
TNF β	359-81-11	7327			■				■								■		

* 表格未列出全部产品。请登录 thermofisher.com/flowantibodies, 搜索流式细胞抗体的完整产品目录

表3. 小鼠细胞因子刺激指南。

小鼠细胞因子	细胞来源	活化	孵育时间	重刺激	细胞内阻断	克隆(抗体)
GM-CSF	Mouse spleen	Con A (3 µg/mL) (2 d)/IL-2 (20 ng/mL) + IL-4 (20 ng/mL) (3 d)	2 d/3 d	Anti-CD3 (10 µg/mL immobilized) + anti-CD28 (2 µg/mL soluble) (5 hr)	Brefeldin A	MP1-22E9
IFN γ	Mouse spleen	Con A (3 µg/mL) (2 d)/IL-2 (20 ng/mL) + IL-4 (20 ng/mL) (3 d)	2 d/3 d	Anti-CD3 (10 µg/mL immobilized) + anti-CD28 (2 µg/mL soluble) (5 hr)	Brefeldin A	XMG1.2
IL-1 α	Mouse PEC	mIFN γ (100 ng/mL) (2 hr)/LPS (100 ng/mL) (22 hr)	2 hr/22 hr	–	Brefeldin A	ALF-161
IL-1 β	Mouse PEC	LPS (100 ng/mL) (22 hr)	22 hr	–	Monensin	NJTEN3
IL-2	Mouse spleen	Con A (3 µg/mL) (2 d)/IL-2 (20 ng/mL) + IL-4 (20 ng/mL) (3 d)	2 d/3 d	Anti-CD3 (10 µg/mL immobilized) + anti-CD28 (2 µg/mL soluble) (5 hr)	Brefeldin A	JES6-5H4
IL-4	Mouse spleen	Th2 polarized	6 d	PMA (50 ng/mL) + Ionomycin (1 µg/mL) (5 hr)	Brefeldin A	BVD6-24G2, 11B11
IL-5	Mouse splenic CD4	Con A (3 µg/mL) (2 d)/IL-2 (20 ng/mL) + IL-4 (20 ng/mL) (3 d)	2 d/3 d	Anti-CD3 (10 µg/mL immobilized) + anti-CD28 (2 µg/mL soluble) (5 hr)	Brefeldin A	TRFK5
IL-6	Mouse PEC	LPS (100 ng/mL) (22 hr)	22 hr	–	Monensin	MP5-20F3
IL-10	Mouse spleen	Con A (3 µg/mL) (2 d)/IL-2 (20 ng/mL) + IL-4 (20 ng/mL) (3 d)	2 d/3 d	Anti-CD3 (10 µg/mL immobilized) + anti-CD28 (2 µg/mL soluble) (5 hr)	Brefeldin A	JES5-16E3, JES5-2A5
IL-12/IL-23 (p40)	Mouse PEC	LPS (100 ng/mL) (22 hr)	22 hr	–	Brefeldin A	C17.8
IL-13	Mouse spleen	Th2 polarized	6 d	PMA (50 ng/mL) + Ionomycin (1 µg/mL) (5 hr)	Brefeldin A	eBio13A
IL-17A	Mouse spleen	Th17 polarized	6 d	PMA (50 ng/mL) + Ionomycin (1 µg/mL) (5 hr)	Monensin	eBio17B7
IL-17F	Mouse spleen	Th17 polarized	6 d	PMA (50 ng/mL) + Ionomycin (1 µg/mL) (5 hr)	Monensin	eBio18F10
IL-21	Mouse spleen	Th17 polarized	9 d	PMA (50 ng/mL) + Ionomycin (1 µg/mL) (5 hr)	Monensin	FFA21
IL-22	Mouse spleen	Th17 polarized	12 d	PMA (50 ng/mL) + Ionomycin (1 µg/mL) (5 hr)	Brefeldin A	IL22JOP
IL-23 p19	Mouse bone marrow	mGM-CSF (40 ng/mL)	8 d	LPS (1 µg/mL) (24 hr)	Monensin	fc23cpg
TNF α	Mouse spleen	Con A (3 µg/mL) (2 d)/IL-2 (20 ng/mL) + IL-4 (20 ng/mL) (3 d)	2 d/3 d	Anti-CD3 (10 µg/mL immobilized) + anti-CD28 (2 µg/mL soluble) (5 hr)	Brefeldin A	MP6-XT22, TN3-19

注释: 小鼠PEC = 巯基乙酸盐诱导的小鼠腹腔巨噬细胞; con A = 刀豆球蛋白A; LPS = 脂多糖; PMA = 豆蔻酰佛波醇乙酯; 2 d = 2天培养; 3 d = 3天培养; 5 hr = 5小时培养。

表4. 人细胞因子刺激指南。

人细胞因子	细胞来源	活化	孵育时间	重刺激	细胞内阻断	克隆(抗体)
G-CSF	PBMC	LPS (1 µg/mL)	24 hr	–	Monensin	8F5CSF
GM-CSF	PBMC	PMA (30–50 µg/mL) /Ionomycin (1 µg/mL)	5 hr	–	Monensin	BVD2-21C11
IFN γ	PBMC	PMA (30–50 µg/mL) /Ionomycin (1 µg/mL)	5 hr	–	Brefeldin A	4S.B3
IL-1 α	PBMC	LPS (1 µg/mL)	24 hr	–	Monensin	364/3B3-14, CRM8
IL-1 β	PBMC	LPS (100 µg/mL)	4 hr	–	Brefeldin A	CRM56
IL-1RA	PBMC	LPS (100 µg/mL)	24 hr	–	Brefeldin A	CRM17
IL-2	PBMC	PMA (30–50 µg/mL) /Ionomycin (1 µg/mL)	4–6 hr	–	Brefeldin A	MQ1-17H12
IL-4	PBMC	PMA (30–50 µg/mL) /Ionomycin (1 µg/mL)	4–6 hr	–	Brefeldin A	8D4-8
IL-5	CD4	Th2-polarizing cultures	6 d	PMA (50 µg/mL) + Ionomycin (1 µg/mL) (5 hr)	Brefeldin A	TRFK5, JES1-5A10
IL-6	PBMC	LPS (100 µg/mL)	24 hr	–	Brefeldin A	MQ2-13A5
IL-9	CD4	Th2-polarizing cultures	6 d	PMA (50 µg/mL) + Ionomycin (1 µg/mL) (5 hr)	Monensin	MH9A4
IL-10	CD4	Th2-polarizing cultures	6 d	PMA (50 µg/mL) + Ionomycin (1 µg/mL) (5 hr)	Monensin	JES3-9D7
IL-12/IL-23 (p40)	PBMC	hIFN γ (100 µg/mL) (2 hr)/LPS (100 µg/mL) (22 hr)	2 hr/22 hr	–	Brefeldin A	C8.6
IL-13	CD4	Anti-CD3 (10 µg/mL, immobilized) + anti-CD28 (2 µg/mL, soluble) + IL-2 (10 µg/mL) + IL-4 (20 µg/mL) (2 d); IL-2 (10 µg/mL) + IL-4 (20 µg/mL) (3 d)	2 d/3 d	PMA (5 µg/mL) + Ionomycin (500 µg/mL) (4 hr)	Brefeldin A	PVM13-1
IL-17A	PBMC	Th17-polarizing cultures	6 d	PMA (50 µg/mL) + Ionomycin (1 µg/mL) (5 hr)	Brefeldin A	eBio64CAP17, eBio64DEC17
IL-17F	PBMC	Th17-polarizing cultures	6 d	PMA (50 µg/mL) + Ionomycin (1 µg/mL) (5 hr)	Brefeldin A	SHLR17
IL-21	PBMC	PMA (30–50 µg/mL)/Ionomycin (1 µg/mL)	4–7 hr or 12–18 hr	–	Brefeldin A	eBio3A3-N2
IL-22	CD4	Th17-polarizing cultures	6 d	PMA (50 ng/mL) + Ionomycin (1 µg/mL) (5 hr)	Brefeldin A	IL22JOP
IL-23 p19	PBMC	hGM-CSF (40 µg/mL) + hIL-4 (40 µg/mL)	6 d	LPS (1 µg/mL) (24 hr)	Monensin	23dcdp
MCP-1/CCL2	PBMC	LPS (1 µg/mL)	24 hr	–	Monensin	2H5, 5D3-F7
RANTES/CCL5	PBMC	LPS (1 µg/mL)	24 hr	–	Monensin	VL1
TNF α	PBMC	PMA (30–50 µg/mL) /Ionomycin (1 µg/mL)	5 hr	–	Brefeldin A	MAb11
TNF β	PBMC	Th1-polarizing cultures	6 d	PMA (50 µg/mL) + Ionomycin (1 µg/mL) (5 hr)	Monensin	359-81-11

趋化因子抗体

表5. Invitrogen™ eBioscience™趋化因子抗体。*

小鼠						紫色激光 eFluor 450	蓝色激光			绿色、黄绿色激光					红色激光			
抗原	克隆	货号	纯化	功能级	生物素		FITC or Alexa Fluor 488	PerCP-Cyanine5.5	PerCP-eFluor 710	PE	PE-eFluor 610	PE-Cyanine5	PE-Cyanine5.5	PE-Cyanine7	Alexa Fluor 532	APC or eFluor 660	Alexa Fluor 700	APC-eFluor 780
CCL2 (MCP-1)	2H5	7096	■	■	■		■			■								
CCL3 (MIP-1 α)	DNT3CC	7532					■		■						■			
CXCL9 (MIG)	MIG-2F5.5	3009							■						■			
人																		
CCL2 (MCP-1)	5D3-F7	7099	■						■						■			
CCL3 (MIP-1 α)	CR3M	9706					■		■									
CCL4 (MIP-1 β)	FL34Z3L	7540						■							■			
CCL5 (RANTES)	VL1	9905													■			
CCL7 (MCP-3)	OLGMASCE	7077							■						■			
CCL8 (MCP-2)	DWZEE	9789													■			
CXCL1 (GRO α)	KTYFLF	7515													■			
CXCL10 (IP-10)	4NY8UN	9744						■	■									

* 表格未列出全部产品。请登录 thermofisher.com/flowantibodies, 搜索流式细胞抗体的完整产品目录

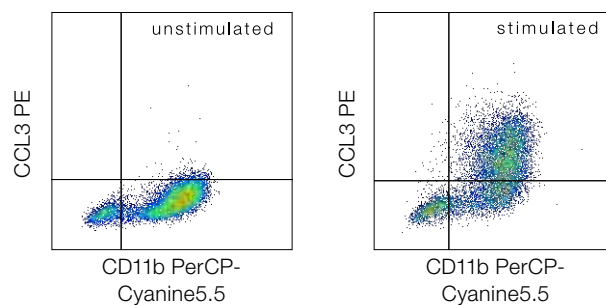


图2. 小鼠巨噬细胞CCL3 (MIP-1)的染色。巯基乙酸盐诱导的BALB/c小鼠腹腔巨噬细胞未经过刺激(左)或在Invitrogen™ eBioscience™蛋白转运抑制剂混合液(货号: 00-4980)存在的条件下使用LPS (货号: 00-4976)刺激5小时(右)。利用抗小鼠CD11b PerCP-Cyanine5.5 (货号: 45-0112)和抗小鼠CCL3 (MIP-1) PE (货号: 12-7532)进行细胞内染色, 利用Invitrogen™ eBioscience™细胞内固定和破膜缓冲液组(货号: 88-8824)及相应的实验方案进行固定和破膜处理。使用Invitrogen™ eBioscience™可固定的细胞活性染料eFluor™ 450 (货号: 65-0863)测定总活细胞, 用于分析。

效应分子抗体

表6 Invitrogen™ eBioscience™效应分子抗体。*

小鼠						紫色激光	蓝色激光			绿色、黄绿色激光					红色激光			
抗原	克隆	货号	纯化	功能级	生物素		eFluor 450	FITC or Alexa Fluor 488	PerCP-Cyanine5.5	PerCP-eFluor 710	PE	PE-eFluor 610	PE-Cyanine5	PE-Cyanine5.5	PE-Cyanine7	Alexa Fluor 532	APC or eFluor 660	Alexa Fluor 700
Granzyme A	GzA-3G8.5	5831				■			■	■				■		■		
Granzyme B	NGZB	8898				■	■		■	■				■		■		
IDO	mIDO-48	9473							■							■		
NOS2 (iNOS)	CXNFT	5920	■				■			■	■			■		■		
Perforin	eBioOMAK-D	9392	■				■			■						■		
人																		
Granulysin	eBioDH2 (DH2)	8828								■								
Granzyme A	CB9	9177												■		■		
Granzyme B	GB11	8899								■								
Granzyme K	G3H69	8897							■									
Granzyme M	4B2G4	9774																
IDO	eyedio	9477							■	■						■		
Myeloperoxidase (MPO)	MPO455-8E6	1299	■			■	■			■								
PARP (Cleaved)	HLNC4	6668	■			■	■			■								
Perforin	dG9 (delta G9)	9994	■				■		■	■						■		

* 表格未列出全部产品。请登录 thermofisher.com/flowantibodies，搜索流式细胞抗体的完整产品目录

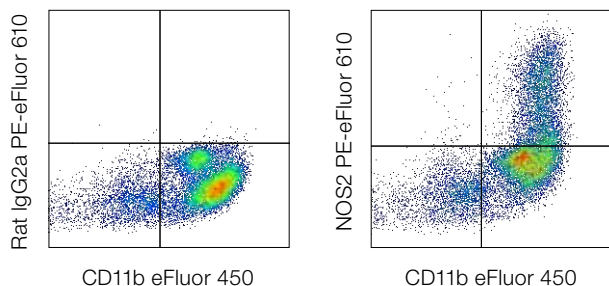


图3. 巯基乙酸盐诱导的小鼠腹腔渗出细胞经刺激后的NOS2 (iNOS) 染色。巯基乙酸盐诱导的小鼠腹腔巨噬细胞经过LPS (货号: 00-4976) 刺激过夜，用Invitrogen™ eBioscience™抗小鼠CD11b eFluor™ 450 (货号: 48-0112)进行表面染色，然后利用细胞内固定和破膜缓冲液 (货号: 88-8824)及相应的实验方案进行固定和破膜处理。随后利用Invitrogen™ eBioscience™大鼠IgG2a K同种型对照PE-eFluor™ 610 (货号: 61-4321 [左])或抗小鼠NOS2 PE-eFluor™ 610 (货号: 61-5920 [右])进行细胞内染色。使用Invitrogen™ eBioscience™细胞活性染料eFluor™ 506 (货号: 65-0866)设门活细胞，用于分析。

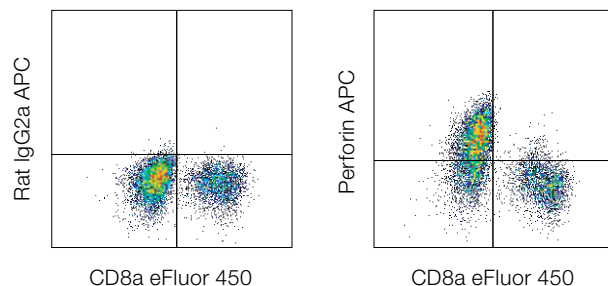


图4. 经刺激的小鼠脾细胞穿孔蛋白的染色。BALB/c脾细胞经Invitrogen™ eBioscience™小鼠IL-2重组蛋白(货号: 14-8021)刺激4天。收集细胞，并用Invitrogen™ eBioscience™抗小鼠CD8a eFluor™ 450结合(货号: 48-0081)进行染色，然后利用细胞内固定和破膜缓冲液(货号: 88-8824)及相应的实验方案进行固定和破膜处理。随后利用大鼠IgG2a K同种型对照APC (货号: 17-4321 [左])或抗小鼠穿孔素APC (货号: 17-9392 [右])进行细胞内染色。淋巴细胞设门内的细胞用于分析。

其他胞内蛋白抗体

表7. 其他Invitrogen™ eBioscience™胞内蛋白抗体。*

小鼠						紫色激光	蓝色激光				绿色、黄绿色激光					红色激光		
抗原	克隆	货号	纯化	功能级	生物素	eFluor 450	FITC or Alexa Fluor 488	PerCP-Cyanine5.5	PerCP-eFluor 710	PE	PE-eFluor 610	PE-Cyanine5	PE-Cyanine5.5	PE-Cyanine7	Alexa Fluor 532	APC or eFluor 660	Alexa Fluor 700	APC-eFluor 780
CD63	NVG-2	0631							■					■		■		
CD79a	24C2.5	0791	■				■									■		
CD107a (LAMP-1)	eBio1D4B	1071	■		■	■	■		■	■						■		
CD107b (LAMP-2)	eBioABL-93	1072	■		■		■									■		
CD152 (CTLA-4)	UC10-4B9	1522	■		■					■						■		
CD289 (TLR9)	M9.D6	9093	■		■		■											
Cytochrome C	6H2	6601	■				■											
Notch1	mN1A	5785	■		■					■								
IκBα	MFRDTRK	9036								■								
Themis	1TMYS	5918								■						■		
ZAP-70	1E7.2	6695	■		■		■			■						■		
人																		
CD63	H5C6	0639				■				■				■		■		
CD68	eBioY1/82A	0689	■		■		■			■				■				
CD79a	HM47	0792						■	■	■								■
CD107a (LAMP-1)	eBioH4A3	1079	■		■	■	■		■	■	■					■		
CD107b (LAMP-2)	eBioH4B4	1078	■		■		■									■		
CD152 (CTLA-4)	14D3	1529	■	■	■				■	■								
CD208 (DC-LAMP)	31B	2089														■		
CD217 (IL-17Ra)	424LTS	7917		■					■							■		
CD247 (CD3ζ)	6B10.2	2479							■	■								
CD289 (TLR9)	eB72-1665	9099	■							■						■		
Cytochrome C	6H2	6601	■				■											
FREB (FCRLA, FcRX)	N28.1	5847	■															
LAT	LAT.10-17	9967	■							■						■		
Notch1	mN1A	5785	■		■					■								
IκBα	MFRDTRK	9036								■								
SAP	XLP-1D12	9787								■								
SYK	4D10.1	6696	■							■						■		
ZAP-70	1E7.2	6695	■		■		■			■						■		

* 表格未列出全部产品。请登录 thermofisher.com/flowantibodies, 搜索流式细胞抗体的完整产品目录

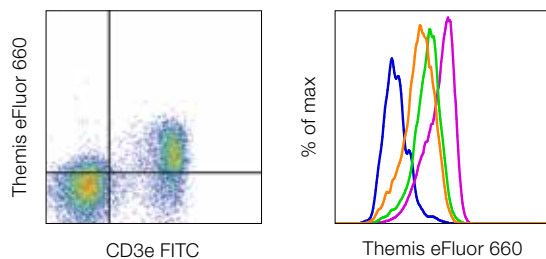


图5. 小鼠胸腺细胞themis的双阴性、双阳性、CD8⁺单阳性及CD4⁺单阳性染色。左：用抗小鼠CD3e FITC (货号：11-0031)对小鼠脾细胞进行表面染色，然后使用Invitrogen™ eBioscience™抗小鼠Themis eFluor™ 660 (货号：50-5918)进行胞内染色，利用细胞内固定和破膜缓冲液(货号：88-8824)及相应的实验方案进行固定和破膜处理。淋巴细胞设门内的细胞用于分析；象限线的划分基于同种型对照。右：用抗小鼠CD4 FITC (货号：11-0042)、Invitrogen™ eBioscience™抗小鼠CD8a eFluor™ 450 (货号：48-0081)、抗小鼠CD25 PerCP-Cyanine5.5 (货号：45-0251)和抗人/小鼠CD44 PE-Cyanine7 (货号：25-0441)对小鼠胸腺细胞进行表面染色，然后使用可固定的细胞活性染料eFluor 506 (货号：65-0866)染色。用抗小鼠Themis eFluor 660 (货号：50-5918)进行细胞内染色，利用细胞内固定和破膜缓冲液(货号：88-8824)及相应的实验方案进行固定和破膜处理。CD4⁺ CD8⁻ CD25⁻ CD44⁺ 双阴性(蓝色直方图)、CD4⁺ CD8⁺ 双阳性(粉色直方图)、CD8⁺ 单阳性(绿色直方图)或CD4⁺单阳性(橙色直方图)设门内的单个活细胞用于数据分析。

核内染色

转录因子

转录因子是与DNA结合的蛋白质，通过调控信使RNA的合成来调控基因表达。对免疫细胞中转录因子的表达和调控更深入了解有望揭示新的细胞类型和新的治疗方法。

采用其他蛋白检测方法(如蛋白质免疫印迹)检测细胞群体中低表达水平的转录因子颇具挑战性。确定异质性细胞群体中的细胞转录因子表达则更为复杂。幸运的是，利用流式细胞术可以检测异质性细胞群体中不同免疫细胞亚群的转录因子，为分析免疫应答提供了强大的方法。先参阅下面有关胞内染色缓冲液的内容，然后再进行转录因子染色分析。

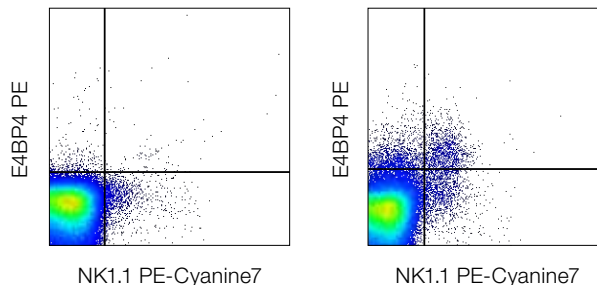


图6. 刺激的小鼠NK细胞中的E4BP4 (NFIL3)染色。小鼠脾细胞未经刺激(左)或用Invitrogen™ eBioscience™小鼠IL-15/IL-15R Complex Carrier-Free重组蛋白(货号: 34-8152 [右])刺激过夜，再用抗小鼠NK1.1 PE-Cyanine7 (货号: 25-5941)和抗小鼠E4BP4 (NFIL3) PE (货号: 12-5927)染色。利用Invitrogen™ eBioscience™ Foxp3/转录因子染色缓冲液(货号: 00-5523) 及相应的实验方案对E4BP4进行胞内染色。设门淋巴细胞用于分析。

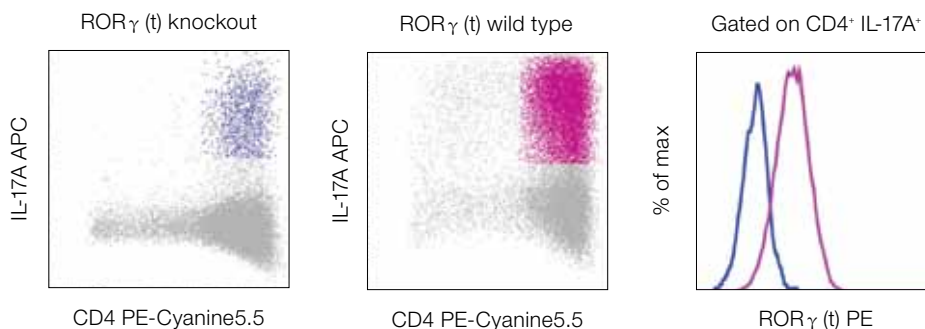


图7. 利用流式细胞仪检测ROR (t)，鉴别Th17细胞。从ROR (t)缺陷型(左图)或野生型(中图)小鼠脾脏和淋巴结中分选CD4⁺ T细胞，在Th17极化条件下培养3天，使用抗小鼠CD4 PE-Cyanine5.5 (货号: 35-0042)、抗小鼠IL-17A APC (货号: 17-7177)和抗人/小鼠ROR (t) PE (货号: 12-6988)染色。直方图显示了ROR (t)缺陷型小鼠(蓝线)和野生型小鼠(粉线)中CD4⁺ IL-17A⁺设门细胞的ROR (t)染色(右图)。分析淋巴细胞设门内的细胞。数据由纽约大学的Littman博士友情提供。

转录因子/核内蛋白抗体

表8. Invitrogen™ eBioscience™小鼠转录因子/核内蛋白抗体。*

小鼠						紫色激光	蓝色激光			绿色、黄绿色激光					红色激光			
抗原	克隆	货号	纯化	功能级	生物素	eFluor 450	FITC or Alexa Fluor 488	PerCP-Cyanine5.5	PerCP-eFluor 710	PE	PE-eFluor 610	PE-Cyanine5	PE-Cyanine5.5	PE-Cyanine7	Alexa Fluor 532	APC or eFluor 660	Alexa Fluor 700	APC-eFluor 780
AHR	4MEJJ	5925					■			■						■		
Aiolos	8B2	5789	■							■						■		
AIRE	5H12	5934	■				■									■		
Bcl6	BCL-DWN	5453							■	■						■		
β-Catenin	15B8	2567	■				■			■						■		
BrdU	BU20A	5071	■			■	■		■	■						■		
c-Maf	sym0F1	9855							■							■		
c-Rel	1RELAH5	6111	■							■						■		
E4BP4 (NFIL3)	S2M-E19	5927								■						■		
Egr2	erongr2	6691								■						■		
EOMES	Dan11mag	4875	■			■	■		■	■	■			■		■		
Eos	ESB7C2	5758								■						■		
Foxp3	FJK-16s	5773	■		■	■	■	■		■	■	■	■	■	■	■	■	
Foxp3	150D/E4	4774	■				■			■						■		■
GATA-3	TWAJ	9966	■						■	■						■		
Helios	22F6	9883				■	■		■	■	■					■		
IκBζ	LK2NAP	6801	■						■	■						■		
IRF4	3E4	9858	■			■	■		■	■						■		
IRF8	V3GYWCH	9852							■	■						■		
Ki-67	SoIA15	5698	■		■	■	■		■	■	■			■		■		
Nanog	eBioMLC-51	5761	■				■			■						■		
Nur77	12.14	5965	■				■		■	■						■		
Oct3/4	EM92	5841	■				■			■						■		
Pax5	1H9	9918	■							■						■		
PLZF	Mags.21F7	9320					■			■						■		
Sox2	Btjce	9811	■				■			■						■		
RORγ (t)	B2D	6981	■						■	■	■					■		
Runx1	RXDMC	9816								■						■		
T-bet	eBio4B10	5825	■					■		■				■		■		
TdT	19-3	5846								■						■		
ThPOK	2POK	5928								■						■		
TOX	TXRX10	6502	■							■						■		

* 表格未列出全部产品。请登录 thermofisher.com/flowantibodies, 搜索流式细胞抗体的完整产品目录

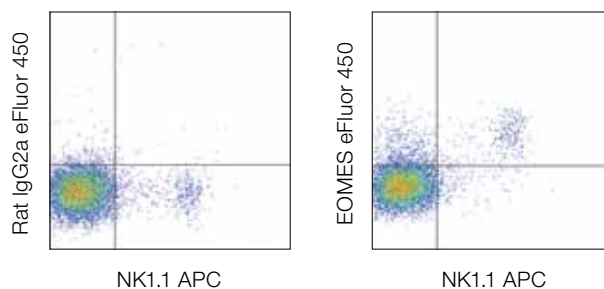


图8. 小鼠脾细胞中的EOMES染色。使用抗小鼠NK1.1 APC (货号: 17-5941)对C57Bl/6脾细胞进行表面染色, 然后用Foxp3/转录因子染色缓冲液(货号: 00-5523)及相应的实验方案进行固定和破膜处理。利用Invitrogen™ eBioscience™大鼠IgG2a K同种型对照eFluor™ 450 (货号: 48-4321 [左])或抗小鼠EOMES eFluor™ 450 (货号: 48-4875 [右])进行细胞内染色。设门淋巴细胞用于分析。

表8. Invitrogen™ eBioscience™人转录因子/核内蛋白抗体。*

人						紫色激光	蓝色激光			绿色、黄绿色激光					红色激光			
抗原	克隆	货号	纯化	功能级	生物素	eFluor 450	FITC or Alexa Fluor 488	PerCP-Cyanine5.5	PerCP-eFluor 710	PE	PE-eFluor 610	PE-Cyanine5	PE-Cyanine5.5	PE-Cyanine7	Alexa Fluor 532	APC or eFluor 660	Alexa Fluor 700	APC-eFluor 780
AHR	FF3399	9854	■						■	■				■		■		
BATF	MBM7C7	9860							■	■						■		
Bcl2	10C4	6992	■			■								■		■		
Bcl6	BCL-UP	9880							■							■		
β-Catenin	15B8	2567	■				■			■						■		
BrdU	BU20A	5071	■			■	■		■	■						■		
c-Maf	sym0F1	9855							■							■		
E4BP4 (NFIL3)	MABA223	9812								■								
Egr1	HEGR1DS	9851							■	■								
EOMES	WD1928	4877					■		■	■	■					■		
Foxp3	150D/E4	4774	■				■			■						■		
Foxp3	236A/E7	5774	■		■	■	■			■						■		
Foxp3	PCH101	4776	■		■	■	■	■		■	■		■	■	■	■	■	
GATA-3	TWAJ	9966	■						■	■						■		
Helios	22F6	9883				■	■		■	■						■		
IκBζ	hft2nap	9853								■								
IRF4	3E4	9858	■			■	■		■	■						■		
IRF5	ALYSCLN	9698														■		
IRF8	V3GYWCH	9852							■	■						■		
Ki-67	20Raj1	5699	■		■	■	■		■	■	■			■		■		
OCT3/4	EM92	5841	■				■			■						■		
Pax5	1H9	9918	■							■						■		
PCNA	PC10 (3F81)	9910	■		■		■			■								
PLZF	Mags.21F7	9320					■			■								
Sox2	Btjce	9811	■				■			■						■		
Survivin	STLALYV	9176	■				■		■	■						■		
RORγ (t)	AFKJS-9	6988	■							■						■		
Runx1	RXDMC	9816								■								
T-bet	eBio4B10	5825	■					■		■				■		■		
TdT	19-3	5846								■								
TOX	TXRX10	6502	■							■						■		

* 表格未列出全部信息。请登录 thermofisher.com/flowantibodies, 搜索流式细胞抗体的完整产品目录

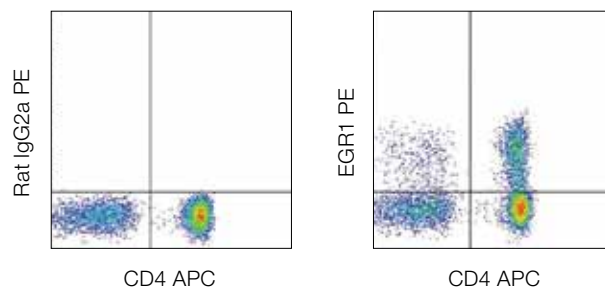


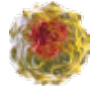
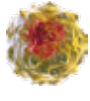
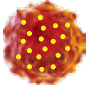

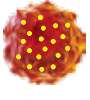
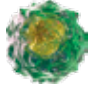
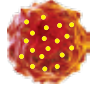
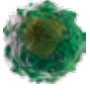

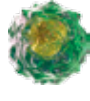

图9. 人的活化T细胞中的Egr1染色。使用人CD3功能级纯化抗体(货号: 16-0037)刺激正常的人外周血细胞2小时。然后利用抗人CD4 APC (货号: 17-0047)和大鼠IgG2a K同种型对照PE (货号: 12-4321 [左])或抗人EGR1 PE (货号: 12-9851 [右])进行细胞内染色, 利用Foxp3/转录因子染色缓冲液(货号: 00-5523)及相应的实验方案进行固定和破膜处理。分析淋巴细胞设门内的细胞。

胞内染色的缓冲液选择

胞内染色时，固定和破膜缓冲液的选择对流式数据的质量和准确性影响显著。我们必须考虑目的蛋白在细胞中的位置，以便选择适当的缓冲液。Invitrogen™ eBioscience™ 缓冲液是根据您要检测的蛋白质的类型和活化状态(如细胞核蛋白、细胞质和分泌蛋白)进行优化的。例如，为实现转录因子的最佳染色，建议使用Foxp3/转录因子染色缓冲液。然而，细胞因子和趋化因子等分泌蛋白最好使用细胞内固定和破膜缓冲液。对细胞中不同区域的蛋白进行染色时，选择正确的缓冲液更具挑战性。应单独优化每种抗体的染色以验证染色结果。下表介绍了选择适当的缓冲体系应遵循的一般规则。

需要更多的帮助才能选择适当的缓冲液？

请登录 thermofisher.com/icflowbufferguide，查看胞内染色缓冲液选择指南，确定缓冲液与细胞内抗原的兼容性。

胞内染色方案一览		胞内染色 (细胞因子)		核内染色 (转录因子) -或- 细胞核和胞浆 (细胞因子和转录因子)	
	表面蛋白染色		表面蛋白染色		表面蛋白染色
	固定细胞		细胞固定+破膜		洗涤
	破膜		洗涤		蛋白染色
	洗涤				
	蛋白染色				
胞内固定和破膜缓冲液 (货号: 88-8824) 试剂盒组分: IC固定缓冲液 破膜缓冲液(10X)		Foxp3/转录因子染色缓冲液 (货号: 00-5523) 试剂盒组分: 固定/破膜浓缩液 固定/破膜稀释液 破膜缓冲液(10X)			

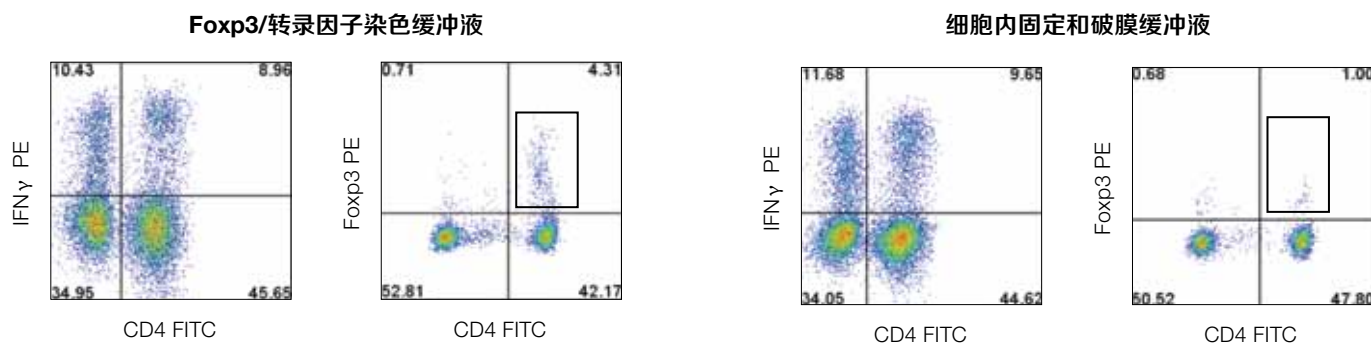


图10. 抗Foxp3和INF抗体染色中缓冲液效果的评估。使用Foxp3/转录因子染色缓冲液(货号: 00-5523 [左])和胞内固定和破膜缓冲液(货号: 88-8824 [右])进行细胞固定和破膜处理，然后使用抗人CD4 FITC (货号: 11-0042)和抗人IFN PE (货号: 12-7311)或抗人Foxp3 PE (货号: 12-5773)进行胞内染色。设门淋巴细胞用于分析。

固定破膜处理后不同抗体克隆染色效果

可选择固定后再对表面抗体进行染色，但取决于固定液对抗体表位的影响。此外，固定破膜后针对同一靶点的每个克隆抗体的表现不一定相当。下表包含了使用Invitrogen™ eBioscience™胞内(IC)固定和破膜缓冲液(货号：88-8824)

或IC固定缓冲液(货号：00-8222)/甲醇处理，不同克隆的染色效果。请注意，固定后染色可能让细胞内聚集的蛋白也被同时染色。

表10. 固定破膜处理后不同克隆的染色效果。

人				
抗原	克隆	IC固定前的活细胞	IC固定和破膜缓冲液处理后	IC固定缓冲液/甲醇处理后
CD3	OKT3	+++	++	+
	UCHT1	+++	+++	+++
	SK7	+++	++*	+++
CD4	HIT3a	+++	+++*	ND
	OKT4	+++	+*	+/-
	RPA-T4	+++	+++*	+
CD5	SK3	+++	+++	+
	UCHT2	+++	+++	+++
CD8	OKT8	+++	+/-	-
	RPA-T8	+++	+++	+/-
	SK1	+++	+++*	+/-
CD8b	SID8BEE	+++	++	++
CD11a	HI111	+++	+++	+
CD11b	CBRM1/5	+	-	+++
	ICRF44	++	-	++
CD11c	3.9	++	+*	++
CD14	61D3	+++	+++*	++
CD19	HIB19	+++	++*	+/-
	SJ25C1	+++	++	ND
CD20	2H7	+++	+++	-
CD25	BC96	+	-	+/-
	CD25-4E3	++	++	ND
CD27	O323	+++	+*	+
CD28	CD28.2	+	-	ND
CD31	WM59	+++	++*	+++
CD33	p67.6	+++	+++*	+++
CD38	HB7	++	-	++
	HIT2	++	-	++
CD40	5C3	++	-	++
CD44	IM7	+++	+++	+++
	2D1	+++	+++	+++
CD45	HI30	+++	+++	+++
	CD45RA	HI100	+++	+++
CD45RO	UCHL1	+++	+++	++
CD62L	DREG-56	++	-	++
CD56	TULY56	++	+	ND
	CMSSB	++	+/-*	-
CD57	TB01	++	++	++
CD62L	DREG56	++	-	ND
CD69	FN50	+++	++	++
CD80	2D10.4	+	-	+
CD83	HB15e	++	++	++
CD86	IT2.2	+	+*	+
CD94	HP-3D9	++	++	++
CD95	DX2	+	-	+
CD127	RDR5	++	+*	++
CD161	HP-3G10	++	++*	+
CD223	3DS223H	++	++	ND

小鼠				
抗原	克隆	IC固定前的活细胞	IC固定和破膜缓冲液处理后	IC固定缓冲液/甲醇处理后
CD3	145-2C11	++	+	+/-
	500A2	+++	+++*	+++
	17A2	+++	+++	+++
CD4	GK1.5	+++	++*	+++
	RM4-5	+++	+++*	+++
CD8	53-6.7	+++	++	++
CD11b	M1/70	++	++	++
CD11c	N418	+++	+++	++
CD19	1D3	+++	++*	-
	MB19-1	++	-	-
CD24	M1/69	+++	+++	++
	PC61.5	+	-	+
CD25	3C7	++	-	+
	7D4	++	++	+
CD39	24DMS1	+	-	++
CD44	IM7	++	++*	++
CD45	30-F11	+++	+++	+++
CD45R (B220)	RA3-6B2	+++	++	+++
CD49b	DX5	++	-	+
CD69	H1.2F3	++	-	-
CD185 (CXCR5)	SPRCL5	++	-	-
CD304	3DS304M	++	++	++
GR-1	RB6-8C5	+++	+++	++
NK1.1	PK136	++	+	+
IgD	11-26c	+++	+++*	++
IgM	II/41	++	++*	++
TCRβ	H57-597	++	++*	++
大鼠				
CD25	OX39	+	-	ND
犬				
CD4	ykix302.9	+++	+	ND
CD5	ykix322.3	+++	-	ND
CD8a	ycate55.9	+++	++	ND
CD44	ykix337.8	+++	++	ND
CD45	ykix716.13	+++	++	ND
CD45R	ykix753.22	+++	++	ND
CD90	ykix337.217	+++	++	ND
MHC class II	ykix334.2	+++	+++	ND

* 固定时间过久不利于克隆染色。
ND = 不确定

特异性磷酸化蛋白的流式分析

大量验证确保成果

利用特异性磷酸化抗体对磷酸化蛋白进行流式分析，为研究人员阐明单细胞水平的信号级联反应提供了一种有效的方法。Invitrogen™ eBioscience™ 流式磷酸化特异性抗体已经过大量样本、条件和平台验证*，确保这些抗体能够稳定可靠地发挥作用。

验证包括：

- 信号通路特异性测试
- 细胞类型特异性测试
- 应用测试：蛋白质免疫印迹、ELISA和免疫化学
- 在不同的胞内固定/破膜缓冲液中的性能
- 小鼠和人交叉反应性测试

信号通路特异性测试

磷酸化特异性染色仅在目的通路被激活的细胞中才能观察到。

细胞类型特异性测试

磷酸化特异性染色仅在蛋白表达的细胞类型中观察到。

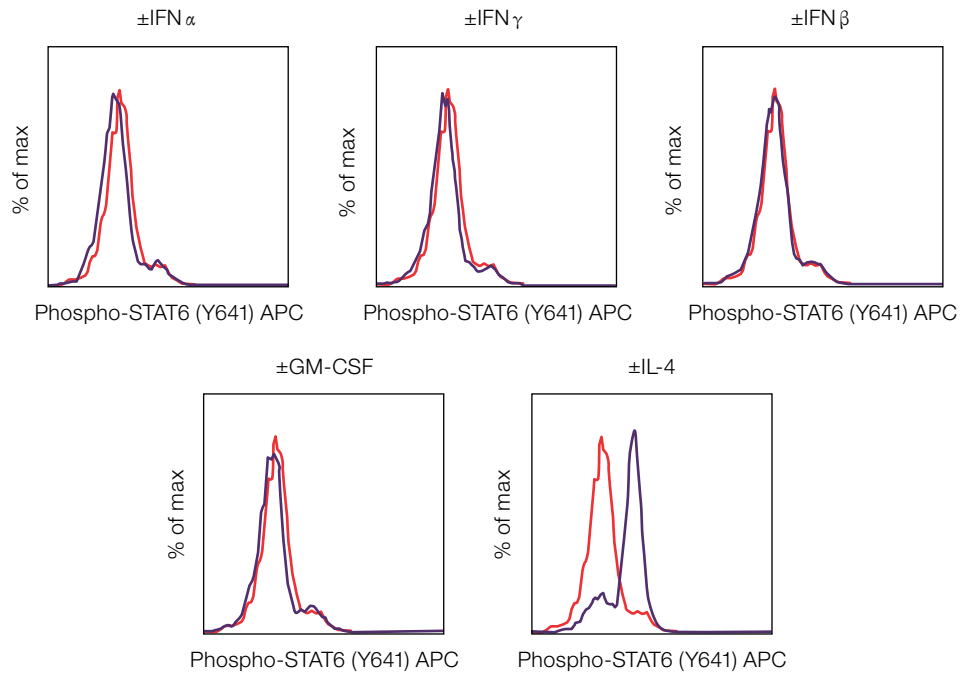


图11. 经过各种细胞因子刺激的U937细胞中磷酸化-STAT6的染色。利用抗人/小鼠磷酸化-STAT6 APC (货号：17-9013)，对未经处理(红色直方图)或经过处理(蓝色直方图)的U937细胞进行细胞内染色。细胞经过如图所示的细胞因子处理。

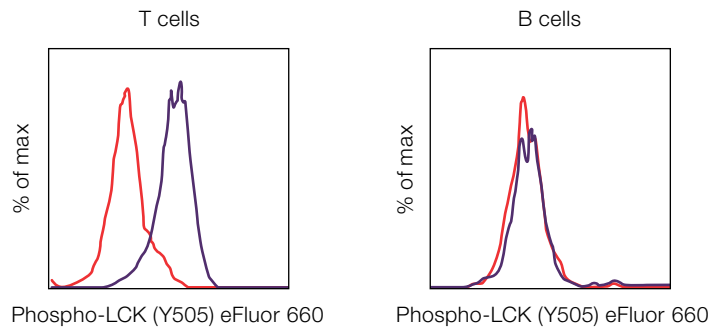


图12. 经过刺激的PBMC中T细胞特异性的磷酸化LCK (Y505)染色。人PBMC未经处理(红色直方图)或用过氧化氢活化的过钒酸钠在37°C处理5分钟(紫色直方图)。然后用抗人/小鼠磷酸化LCK (Y505) eFluor™ 660 (货号：50-9076)、抗人CD3 PE (货号：12-0037)和抗人CD19 FITC (货号：11-0199)进行细胞内染色。与预期一样，LCK磷酸化仅在T细胞中观察到，而B细胞中没有。

* “验证”或其他类似含义的词仅涉及需要进行功能测试以确认抗体适用于标示研究技术的供研究使用的抗体。不保证产品经过临床或诊断使用验证。

应用测试

蛋白质免疫印迹证实了在经过处理的细胞中存在一定分子量的蛋白质，而未经过处理的细胞中没有。如有必要，可使用抑制剂来确保检测特异性。

在不同的固定和破膜缓冲液中的性能

为最大程度地提高与其他抗体染色的兼容性，每种磷酸化特异性抗体都在三种不同的胞内流式分析缓冲体系中进行过测试：胞内固定和破膜缓冲液(货号：88-8824)、Foxp3/转录因子染色缓冲液(货号：00-5523)及胞内固定缓冲液(货号：00-8222)/甲醇破膜处理。每种抗体的技术说明书上注明了建议的缓冲体系。

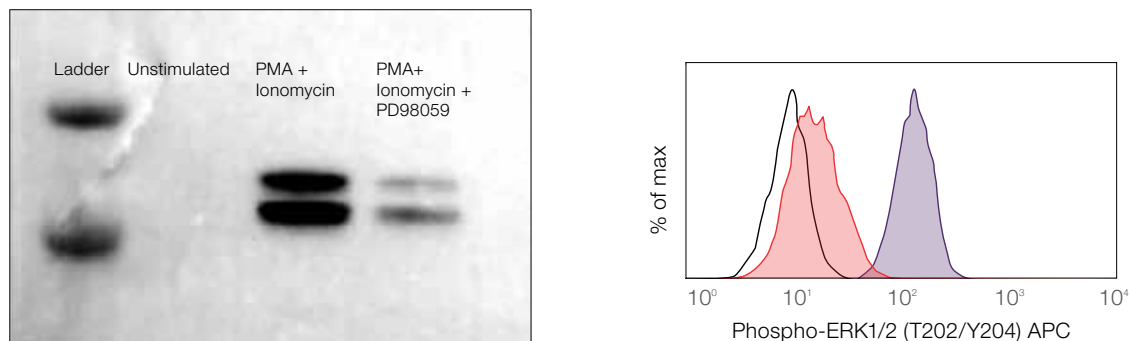


图13. 蛋白质免疫印迹与流式细胞分析比较。左：Jurkat细胞未经过刺激(左图)、经过PMA和离子霉素刺激(中图)或在MEK1/2抑制剂PD98059存在的条件下经过PMA和离子霉素刺激(右图)，利用抗人/小鼠磷酸化ERK1/2 (T202/Y204) (货号：14-9109)对裂解液进行蛋白质免疫印迹分析。右：Jurkat细胞未经过刺激(黑色直方图)、经过PMA和离子霉素刺激(紫色直方图)或在MEK1/2抑制剂PD98059存在的条件下经过PMA和离子霉素刺激(红色直方图)，利用抗人/小鼠磷酸化ERK1/2 (T202/Y204) APC (货号：17-9109)进行细胞内染色。

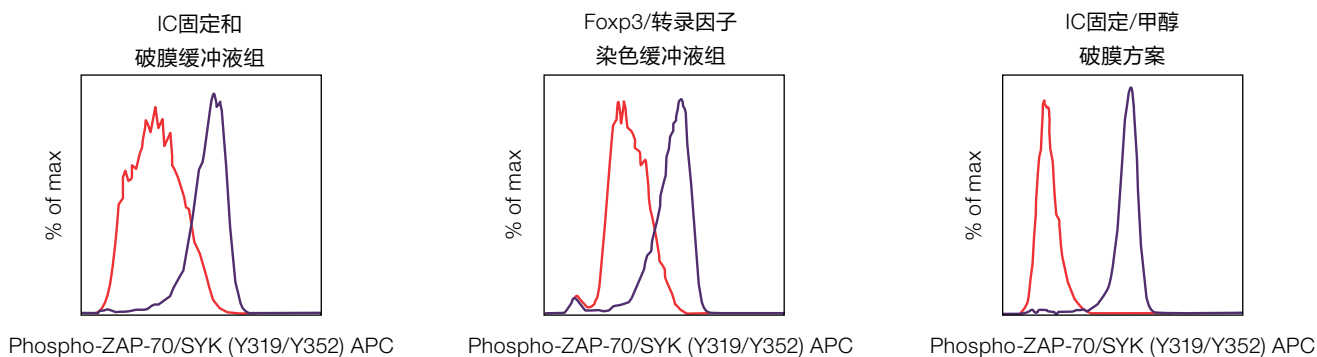


图14. 磷酸化-ZAP-70/SYK (Y319/Y352) APC在不同的细胞内固定和破膜缓冲液中的性能。Jurkat细胞未经过处理(红色直方图)或用过氧化氢活化的过钒酸钠在37°C处理5分钟(紫色直方图)。然后将细胞分为三份，分别用细胞内固定和破膜缓冲液(货号：88-8824 [左])、Foxp3/转录因子染色缓冲液(货号：00-5523 [中])或IC固定缓冲液(货号：00-8222)/甲醇(右)进行固定破膜处理。随后利用抗人/小鼠磷酸化ZAP-70/SYK (Y319/Y352) APC (货号：17-9006)进行细胞内染色，再进行流式细胞分析。

小鼠和人交叉反应性测试

在人和小鼠细胞中测试每种磷酸化特异性抗体，确定种属交叉反应性。磷酸化特异性抗体的种属特异性在抗体名称和技术说明书上均有注明。

多种荧光染料用于流式细胞抗体配色方案

我们提供了品种齐全的抗体，使您可以在目前的流式方案配置参数范围内自由灵活地设计实验。

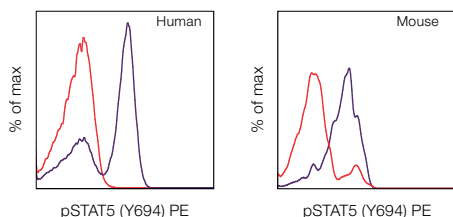


图15. 小鼠和人磷酸化STAT5 (Y694)的交叉反应性。左：人Th2极化的CD4+细胞未经处理(红色直方图)或经IL-2处理15分钟(紫色直方图)，利用抗人/小鼠磷酸化-STAT5 (Y694) PE (货号：12-9010)进行细胞内染色。右：巯基乙酸盐诱导的小鼠腹腔渗出细胞未经处理(红色直方图)或经GM-CSF处理15分钟(紫色直方图)，利用抗人/小鼠磷酸化-STAT5 (Y694) PE (货号：12-9010)进行细胞内染色。分析较大的散射群体中的CD11c+细胞。

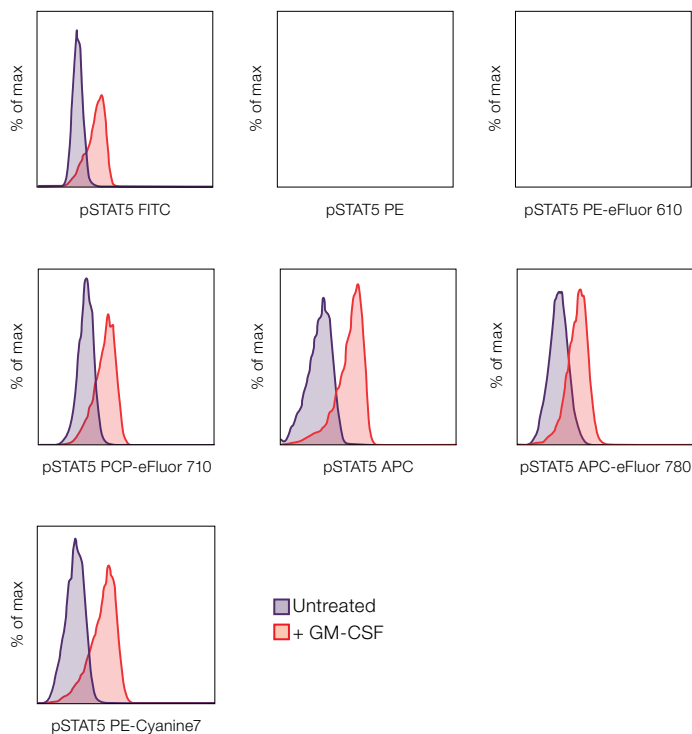


图16. 抗pSTAT5 (Y694)的不同形式比较。U937细胞未经处理(紫色直方图)或经人GM-CSF重组蛋白处理15分钟(货号：14-833 [红色直方图])，利用IC固定/甲醇破膜方案，用不同形式标记的抗人/小鼠磷酸化STAT5 (Y694 [SRBCZX克隆])进行细胞内染色。荧光染料如x轴所示。

表11. Invitrogen™ eBioscience™磷酸化特异性抗体。*

靶点	克隆	货号	人交叉反应性	小鼠交叉反应性	纯化	eFluor 450	FITC	PerCP-eFluor 710	PE	PE-eFluor 610	PE-Cyanine7	APC or eFluor 660	APC-eFluor 780	IC固定/破膜	Foxp3缓冲液组	IC固定/MeOH
p4E-BP1 (T36/T45)	V3NTY24	9107	■	■								■		++	-	+++
pAKT (S473)	SDRNR	9715	■	■								■		++	++	+++
pBTK/ITK (S551/Y511)	M4G3LN	9015	■	■	■			■	■			■		++	++	+++
pERK1/2 (T202/Y204)	MILAN8R	9109	■	■	■			■	■	■		■		-	-	+++
pH2AX (S139)	CR55T33	9865	■	■	■			■	■			■		-	+++	+++
pHistone H3 (S28)	HTA28	9124	■	■								■		++	+	+++
pIκBα (S32/S36)	RILYB3R	9035	■	■								■		+++	-	++
pLCK (Y505)	SRRCHA	9076	■	■				■				■		++	++	+++
pMCL-1 (S159)	RBCERNR	9038	■	■					■			■		++	+	+++
pmtOR (S2448)	MRRBY	9718	■	■				■	■			■		++	++	+++
pNFκB p65 (S529)	B33B4WP	9863	■	■				■	■			■		+++	-	+++
pS6 Ribosomal (S235/S236)	cupk43k	9007	■	■	■			■	■			■		++	++	+++
pSLP-76 (Y128)	HNDZ55	9037	■	■								■		+++	-	+++
pSrc (Y418)	SC1T2M3	9034	■	■	■			■	■			■		++	++	+++
pSTAT1 (Y701)	KIKSI0803	9008	■	■	■	■			■			■		-	-	+++
pSTAT3 (Y705)	LUVNKLA	9033	■	■					■			■		-	-	+++
pSTAT4 (Y693)	4LURPIE	9044	■	■					■			■		-	-	+++
pSTAT5 (Y694)	SRBCZX	9010	■	■			■	■	■	■	■	■	■	-	-	+++
pSTAT6 (Y641)	CHI2S4N	9013	■	■				■	■	■		■		-	-	+++
pSYK (Y348)	moch1ct	9014	■	■					■			■		++	++	+++
pTyrosine	pY20	5001	■	■	■	■		■				■		++	++	+++
pZAP-70/SYK (Y319/Y352)	n3kobu5	9006	■	■				■	■			■		++	++	+++

* 表格未列出全部产品。请登录 thermofisher.com/flowantibodies，搜索流式细胞抗体的完整产品目录

流式分析基因表达

PrimeFlow RNA分析

当细胞随时间或刺激而改变时，Invitrogen™ PrimeFlow™ RNA分析可揭示单个细胞中的RNA和蛋白表达动力学，实现了前所未有的相关性分析。这种新颖的分析仅需标准流式细胞仪，利用荧光原位杂交(FISH)实现了单个细胞内多达4种RNA转录本的同时检测。PrimeFlow RNA分析可与常用的流式细胞荧光抗体兼容，用于细胞表面和胞内染色。此分析是基于稳定技术有大量文献的Invitrogen™ ViewRNA™分析进阶版，viewRNA™是利用显微镜分析细胞和组织内的RNA，结合成对寡核苷酸探针及分bDNA信号放大，实现单细胞水平的基因表达检测。

在流式细胞仪上同时检测RNA表达和蛋白质，可以获得异质性细胞群体中的多参数数据，并在单细胞水平上提供深入且高内涵的细节。相比之下，芯片和测序只能提供大量样本群体的综合基因表达数据；而大量样本的分析往往会掩盖独特的细胞亚群的个体影响。

利用PrimeFlow RNA分析，我们可分析特定细胞群体的转录本表达水平，或在一段时间内进行细胞亚群评估，以便同时测定转录调控和蛋白表达。利用这些独特且宝贵的数据可以回答过去无法回答的问题，并对推动不同生物学领域的研究进展。

- 观察数百万个单细胞基因表达异质性
- 关联同一细胞中RNA和蛋白的表达
- 检测特定细胞亚群中的非编码RNA
- 评估感染细胞中的病毒RNA表达
- 没有相应抗体时分析mRNA表达水平

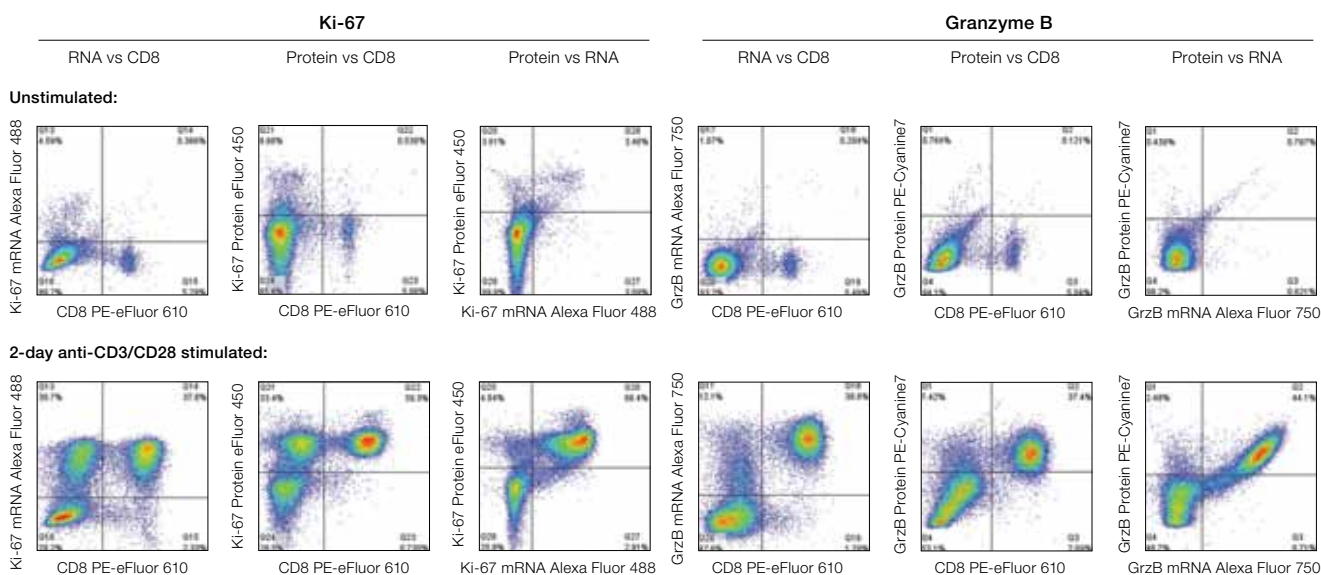


图17. PrimeFlow RNA分析应用。 C57Bl/6脾细胞未经过刺激(上排)或在蛋白转运抑制剂混合液(货号: 00-4980)存在的条件下(最后3个小时培养)经过抗小鼠CD3和CD28功能级纯化抗体(货号: 16-0031和16-0281 [下排])刺激2天, 然后利用PrimeFlow RNA分析试剂盒(货号: 88-18005)进行分析。利用PrimeFlow RNA分析缓冲液及相应的实验方案进行细胞固定和破膜处理, 然后用Invitrogen™ eBioscience™抗小鼠CD8a PE-eFluor™ 610 (货号: 61-0081)、抗小鼠Ki-67 eFluor™ 450 (货号: 48-5698)和抗小鼠粒酶B PE-Cyanine7 (货号: 25-8898)结合物进行细胞内染色。随后, 细胞使用Invitrogen™ 6型小鼠粒酶B Alexa Fluor™ 750 (货号: VB6-16522)、4型小鼠Ki-67 Alexa Fluor™ 488 (货号: VB4-16518)和1型小鼠β-肌动蛋白 Alexa Fluor™ 647 (货号: VB1-10350)目标探针杂交。

PrimeFlow RNA分析技术

荧光原位杂交(FISH)技术功能强大, 可实现固定细胞中核糖核酸靶点的特异性定位。应用的基本前提是通过核酸探针的杂交检测核酸, 从而提供了单细胞水平的基因表达信息。传统的FISH技术由于非特异性结合和低效的信号放大, 往往受到高背景和低灵敏度的限制而无法广泛应用。

PrimeFlow RNA分析将专利的寡核苷酸探针组与bDNA信号放大技术相结合, 利用流式细胞仪分析RNA转录本。bDNA技术提供了独特的RNA检测和信号放大方法, 通过放大报告基因信号而不是放大目标序列(如PCR), 解决了PCR分析结果不稳定的问题, 可以获得一致的结果。

在PrimeFlow RNA分析中, 靶点特异性的探针组包含20至40对可与目标RNA转录本杂交的探针对。信号放大的原理是, 相邻的探针对与bDNA结构(包括放大前体、放大体和荧光染料偶联的标记探针)特异性地杂交, 获得极佳的特异性、低背景和高信噪比(图18和19)。

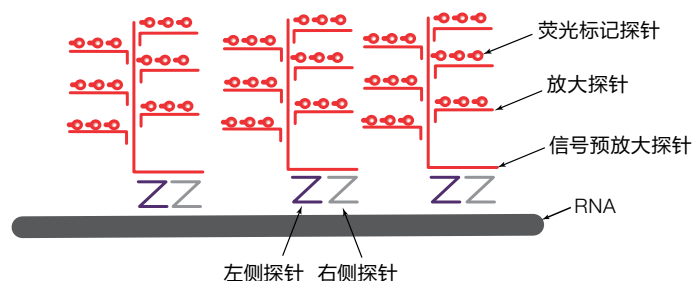


图18. bDNA放大技术原理。

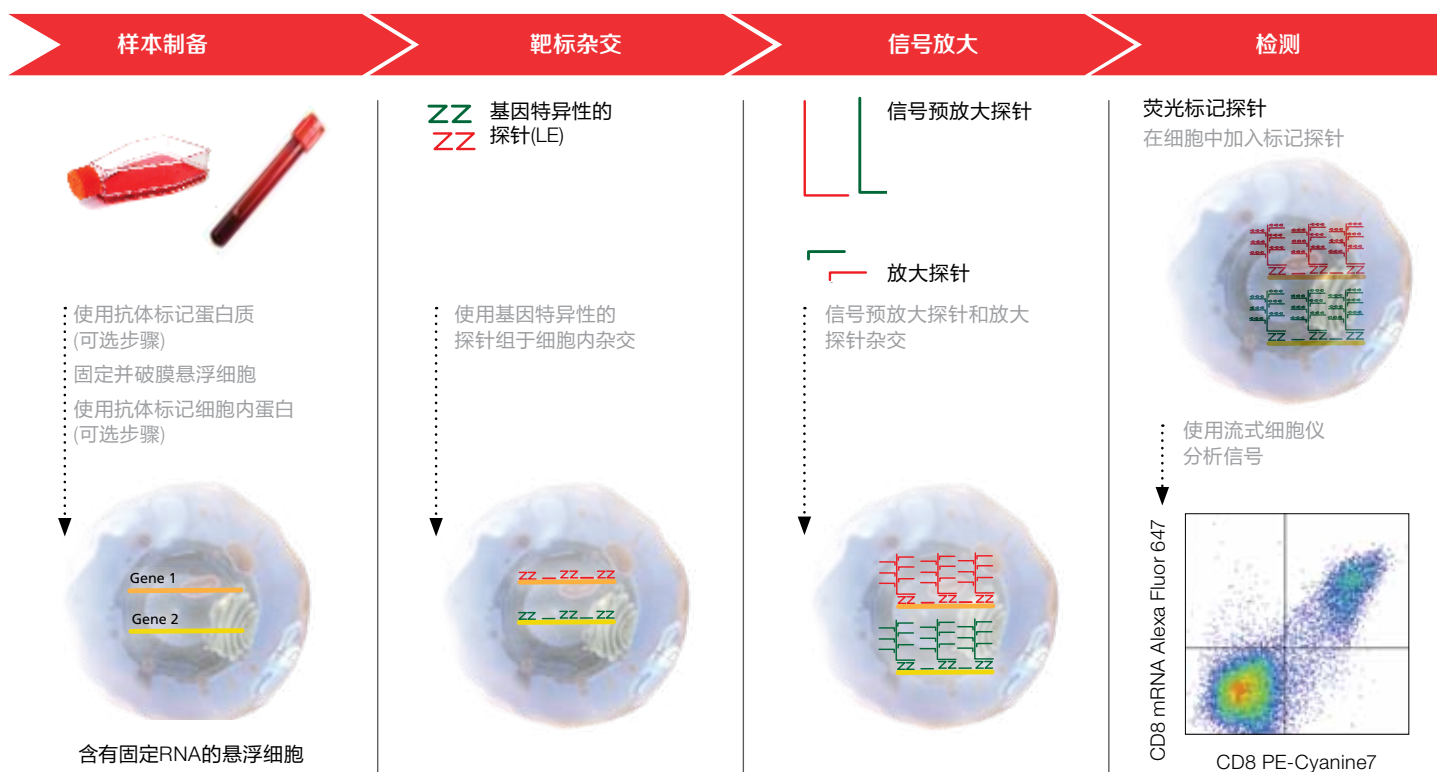


图19. PrimeFlow RNA分析工作流程。该分析工作流程包括下列几个步骤: 抗体染色; 固定和破膜, 包括细胞内染色(如需要); 然后是与包含20至40对寡核苷酸的靶点特异性探针杂交。

细胞内抗体染色方案

方案A: 胞内(胞浆)蛋白

下列方案能在单细胞水平同时分析细胞表面分子和细胞内抗原。在本方案中，固定后破膜，在细胞膜上形成通道孔，这需要破膜缓冲液一直存在于后续步骤中，以便让抗体进入胞浆，同时让未结合的抗体离开细胞。因此，所有的胞内染色都必须是在破膜缓冲液存在的情况下进行。建议在检测单个细胞的胞浆蛋白、细胞因子及其他分泌蛋白时使用这个方案。

对于细胞核蛋白(如转录因子)的检测，请参阅方案B: 核内蛋白染色方案(下一页)。对于一些磷酸化信号分子(如MAPK和STAT蛋白)的检测，首选后面的方案C。

材料

- 12 x 75 mm圆底试管
- Invitrogen™ eBioscience™ 细胞活性染料 eFluor™ 455UV、450、506、520、660和780 (货号: 65-0868、65-0863、65-0866、65-0867、65-0864和65-0865)
- 胞内蛋白荧光标记抗体
- Invitrogen™ eBioscience™ 胞内固定和破膜缓冲液(货号: 88-8824)
- Invitrogen™ eBioscience™ 流式细胞染色缓冲液(货号: 00-4222)
- Invitrogen™ eBioscience™ 细胞刺激混合液(带蛋白转运抑制剂) (500X) (货号: 00-4975)、蛋白转运抑制剂混合液 (500X) (货号: 00-4980)、Brefeldin A溶液(货号: 00-4506) 或莫能菌素溶液(货号: 00-4505)

缓冲液和溶液制备

在使用前，用蒸馏水稀释10X破膜缓冲液浓缩液，制备1X工作溶液。每个样本需要8.5 mL破膜缓冲液。

实验步骤

1. 制备目的细胞，检测细胞内蛋白。请参阅我们的网站上的最佳实验方案：“流式细胞制备”。
2. 为避免因死细胞干扰而造成的假信号，我们建议使用细胞活性染料来排除分析中的死细胞。
3. 按照最佳实验方案“细胞表面抗原染色”中的操作，对细胞表面抗原进行染色。
4. 在最后一次洗涤后，弃去上清，涡旋振荡样本，以彻底重悬细胞。约有100 μ L残留。
5. 加入100 μ L IC固定缓冲液固定细胞，涡旋振荡。
6. 室温避光孵育试管20-60分钟。
7. 无需洗涤，在每管中加入2 mL 1X破膜缓冲液。
8. 室温300-400 x g离心样本5分钟，弃去上清。
9. 用2 mL 1X破膜缓冲液重悬细胞。
10. 室温300-400 x g离心样本5分钟，弃去上清。
11. 用100 μ L 1X破膜缓冲液重悬细胞。加入推荐用量的荧光标记抗体，以检测细胞内抗原，室温避光孵育20-60分钟。
12. 在每管中加入2 mL 1X破膜缓冲液。
13. 室温300-400 x g离心样本5分钟，弃去上清。
14. 每管中加入2 mL流式细胞染色缓冲液。
15. 室温300-400 x g离心样本5分钟，弃去上清。
16. 用适量的流式细胞染色缓冲液重悬染色后的细胞，在流式细胞仪上进行分析。

方案B: 核内蛋白染色方案

下列方案能在单细胞水平同时分析细胞表面分子和细胞内抗原, 包括细胞核抗原。本方案将固定和破膜合并成一个步骤。建议在检测细胞核抗原(如转录因子)时使用本方案, 它同样适用于多种细胞因子的检测。有关Foxp3/转录因子染色缓冲液(货号: 00-5523)与细胞因子抗体的兼容性, 请在线查看我们的细胞内染色缓冲液选择指南:

thermofisher.com/icflowbufferguide

材料

- 12 x 75 mm圆底试管或96孔V或U形底板
- 可固定的细胞活性染料eFluor 455UV、450、506、520、660和780 (货号: 65-0868、65-0863、65-0866、65-0867、65-0864和65-0865)
- [可选]正常小鼠血清
- [可选]正常大鼠血清
- 细胞内蛋白特异性的荧光直标抗体
- Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set(货号: 00-5523)
- 流式细胞染色缓冲液(货号: 00-4222)

缓冲液和溶液制备

- 用Foxp3固定/破膜稀释液(3份)稀释Foxp3固定/破膜浓缩液(1份), 制备新鲜的Foxp3固定/破膜工作液。每个样本需要1 mL固定/破膜工作液。
- 在使用前, 用蒸馏水稀释10X浓缩液, 制备破膜缓冲液1X工作液。如果在试管中染色, 则每个样本需要8.5 mL破膜缓冲液。

在试管中进行实验的步骤

1. 制备目的细胞, 检测细胞内蛋白。请参阅我们的网站上的最佳实验方案: “流式细胞制备”。
2. 为避免因死细胞干扰而造成的假信号, 我们建议使用细胞活性染料来排除分析中的死细胞。
3. 按照最佳实验方案“细胞表面抗原染色”中的操作, 对细胞表面抗原进行染色。
4. 在最后一次洗涤后, 弃去上清, 涡旋振荡样本, 以彻底重悬细胞。

5. 在每管中加入1 mL Foxp3固定/破膜工作液, 涡旋振荡。
6. 4°C或室温避光孵育30-60分钟。(小鼠样本可4°C避光孵育至多18小时。)
7. 无需洗涤, 在每管中加入2 mL 1X破膜缓冲液。
8. 室温300-400 x g离心样本5分钟, 弃去上清。
9. [可选]重复第7-8步。
10. 用100 μ L 1X破膜缓冲液重悬细胞。这是清后最常使用的残留体积。
11. [可选]在细胞中直接加入2 μ L血清, 用2%的正常小鼠/大鼠血清封闭。室温孵育15分钟。
12. 无需洗涤, 加入推荐用量的荧光标记抗体, 检测细胞内抗原, 室温避光孵育至少30分钟。
13. 在每管中加入2 mL 1X破膜缓冲液。
14. 室温300-400 x g离心样本5分钟, 弃去上清。
15. 在每管中加入2 mL 1X破膜缓冲液或流式细胞染色缓冲液。
16. 室温300-400 x g离心样本5分钟, 弃去上清。
17. 用适量的流式细胞染色缓冲液重悬染色后的细胞, 在流式细胞仪上采集样本。

在96孔板中进行实验的步骤

1. 制备目的细胞, 检测细胞内蛋白。请参阅我们的网站上的最佳实验方案: “流式细胞制备”。
2. 为避免因死细胞干扰而造成的假信号, 我们建议使用细胞活性染料来排除分析中的死细胞。
3. 按照最佳实验方案“细胞表面抗原染色”中的操作, 对细胞表面抗原进行染色。
4. 在最后一次洗涤后, 弃去上清, 涡旋振荡样本, 以彻底重悬细胞。
5. 在每孔中加入200 μ L Foxp3固定/破膜工作液。最好在加入溶液后, 让细胞完全重悬于溶液中。可上下吹打使细胞完全重悬。
6. 室温避光孵育30-60分钟。(小鼠样本可4°C避光孵育至多18小时)。

7. 室温300-400 x g离心样本5分钟，弃去上清。
8. 在每孔中加入200 μ L 1X破膜缓冲液。
9. 室温300-400 x g离心样本5分钟，弃去上清。
10. 重复第8-9步。
11. 用残留体积重悬细胞，并用1X破膜缓冲液调整体积至100 μ L。
12. [可选]在细胞中直接加入2 μ L血清，用2%的正常小鼠/大鼠血清封闭。室温孵育15分钟。
13. 无需洗涤，加入推荐用量的荧光标记抗体，检测细胞内抗原，室温避光孵育至少30分钟。
14. 在每孔中加入200 μ L 1X破膜缓冲液。
15. 室温300-400 x g离心样本5分钟，弃去上清。
16. 在每孔中加入200 μ L 1X破膜缓冲液或流式细胞染色缓冲液。
17. 室温300-400 x g离心样本5分钟，弃去上清。
18. 用适量的流式细胞染色缓冲液重悬染色后的细胞，在流式细胞仪上采集样本。

方案C: 固定/甲醇(磷酸化特异性蛋白)

下列方案能同时分析细胞表面分子和一些细胞内的磷酸化信号蛋白。在本方案中, 固定后使用甲醇处理细胞。对于磷酸化蛋白的检测, 适当的刺激条件和磷酸化动力学将根据细胞类型和待分析的特定信号通路而异。例如, 若要诱导磷酸化-STAT1 (Y701)的磷酸化, 可用IFN γ 或IFN α 激活巨噬细胞, 而T细胞中的磷酸化-ERK1/2 (T202/Y204)则可由PMA (佛波酯, 一种蛋白激酶C活化剂)或抗CD3抗体来诱导。

一般注意事项

- 荧光标记的抗体可用于对表面蛋白进行染色, 以便对细胞进行免疫分型, 并进一步分析磷酸化蛋白; 但还有一些有关染色的特别注意事项:
 - 活细胞上表面标记的抗体染色会因为刺激/抑制效应改变信号蛋白的表达。因此, 不建议在细胞刺激之前进行表面染色, 而是在细胞内蛋白染色的同时对表面蛋白进行染色。此外还需要评估并使用可识别固定表位的表面蛋白的抗体克隆。参阅第13页, 了解我们已进行的抗体检测; 否则, 需要凭经验来确定其性能。
 - 如果在固定步骤(第5步)前需要进行表面染色(由于表位变化), 只有当荧光染料能够耐受甲醇时, 细胞才能在固定/甲醇处理前用荧光标记抗体染色。
- 对于贴壁细胞, 我们建议固定贴壁的细胞(第5步)。在固定后, 刮下细胞或用EDTA溶液处理, 收集细胞, 并继续完成操作。如果您不进行表面抗体染色, 或您知道表面蛋白可耐受胰蛋白酶消化, 则可以使用胰蛋白酶。

材料

- 12 x 75 mm圆底试管或96孔圆底或V形底微孔板
- 荧光直标抗体
- 流式细胞染色缓冲液(货号: 00-4222)
- IC固定缓冲液(货号: 00-8222)
- 90-100%甲醇(HPLC级)
- [可选] Fc受体封闭: 小鼠CD16/CD32抗体(货号: 14-0161)或纯化的人Fc受体结合抑制剂(货号: 14-9161)

实验步骤

1. 在适当的培养基中培养目的细胞用于刺激。
2. 计数细胞, 并在适当的培养基中重悬至 $1-5 \times 10^6$ 个细胞/mL。

甲醇耐受荧光染料	甲醇敏感荧光染料
Alexa Fluor 488	PE
eFluor 660	PE-偶联染料
Alexa Fluor 647	PerCP
eFluor 450	PerCP-偶联染料
FITC	APC
Super Bright	APC-偶联染料

3. 在37°C下, 选用适当的时间点刺激细胞。同时37°C孵育未处理的细胞, 作为阴性对照。
4. [可选]如果在固定步骤(第5步)前需要进行表面染色, 则利用耐受甲醇的荧光染料标记的抗体, 按照最佳实验方案“细胞表面抗原染色”中的操作, 对细胞表面抗原进行染色。
5. 在刺激结束时, 直接在细胞中加入等体积的IC固定缓冲液并涡旋振荡, 固定细胞以终止刺激。
6. 室温避光孵育细胞10-60分钟。
7. 室温600 x g离心细胞4-5分钟, 弃去上清。
8. 用残留体积重悬细胞, 加入1 mL冰冷的90-100%甲醇, 涡旋振荡, 置于4°C或冰上孵育至少30分钟。

注: 一旦加入甲醇, 细胞可在-20°C至多保存4周。

9. 用过量体积的流式细胞染色缓冲液洗涤细胞。
10. 室温600 x g离心细胞4-5分钟, 弃去上清。
11. 用流式细胞染色缓冲液重悬细胞至 1×10^6 个细胞/mL。
12. 将 1×10^6 个细胞(100 μ L)分装至单独的流式管中。
13. [可选]在染色前, 利用小鼠CD16/CD32抗体或纯化的人Fc受体结合抑制剂封闭细胞, 以阻断非特异性Fc受体介导的结合。
14. 在每管中加入建议用量的荧光标记抗体, 室温避光孵育30-60分钟。

注: 如有必要, 可同时进行表面染色和细胞内染色。请参阅第13页的表格, 了解能在固定和甲醇处理后染色细胞的抗体克隆。

15. 加入2 mL流式细胞染色缓冲液, 室温600 x g离心4-5分钟。弃去上清。
16. 重复第15步。

17. 用适量的流式细胞染色缓冲液重悬染色后的细胞，在流式细胞仪上分析样本。

在96孔板中进行实验的步骤

1. 在适当的培养基中制备目的细胞用于刺激。
2. 计数细胞，并在适当的培养基中重悬至 $1-5 \times 10^6$ 个细胞/mL。
3. 在96孔板的孔中加入适当的处理试剂100 μ L。
4. 在孔中加入100 μ L细胞，在37°C下于所需的时间点刺激细胞。同时37°C孵育未处理的细胞，作为阴性对照。
5. [可选]如果在固定步骤(第5步)前需要进行表面染色，则利用耐受甲醇的荧光染料标记的抗体，按照最佳实验方案“细胞表面抗原染色”中的操作，对细胞表面抗原进行染色。
6. 在刺激结束时，直接在孔中加入200 μ L的IC固定缓冲液，固定细胞以终止刺激。
7. 室温避光孵育孔板10-60分钟。
8. 室温600 x g离心反应板4-5分钟，弃去上清。
9. 用残留体积重悬细胞沉淀，加入100 μ L冰冷的90-100%甲醇，涡旋振荡，置于4°C或冰上孵育至少30分钟。

注：一旦加入甲醇，细胞可在-20°C至多保存4周。

10. 加入200 μ L流式细胞染色缓冲液。室温600 x g离心细胞4-5分钟，弃去上清。
11. 重复第10步。
12. [可选]在染色前，利用小鼠CD16/CD32抗体或纯化的人Fc受体结合抑制剂封闭细胞，以阻断非特异性Fc受体介导的结合。
13. 在每孔中加入推荐用量的荧光标记抗体，室温避光孵育30-60分钟。

注：如有必要，可同时进行表面染色和细胞内染色。请参阅第13页的表格，了解能在固定和甲醇处理后染色细胞的抗体克隆。

14. 加入200 μ L流式细胞染色缓冲液，600 x g离心4-5分钟。
15. 重复第14步。
16. 用适量的流式细胞染色缓冲液重悬染色后的细胞，在流式细胞仪上分析样本。

高性能流式细胞仪

新款Attune NxT流式细胞仪即将上市 — 紫色激光可配备6个荧光通道

- **扩展紫色激光性能** — 紫色激光可配备6个荧光通道
- **检测** — 从单个样本中获取更多数据，解决复杂的细胞生物学问题
- **研究** — 利用声波聚焦技术的强大功能，可缩短上样时间、降低样本用量、减少仪器堵塞

Invitrogen™ Attune™ NxT流式细胞仪可配置多达4种激光和16个检测参数，我们即将推出紫色激光可配备6个荧光检测器的新款仪器(表4)。6通道紫色激光配置可支持使用Super Bright抗体及其他的紫激光染料(表5)。请登录 thermofisher.com/attune，进一步了解Attune NxT流式细胞仪如何通过简化样本制备、适用更多样本类型(包括肿瘤样本)且无堵塞、利用自动化操作使通量最大化，令研究工作变得更加轻松。



表4. 紫色激光具有6个荧光检测器的Attune NxT流式细胞仪配置。

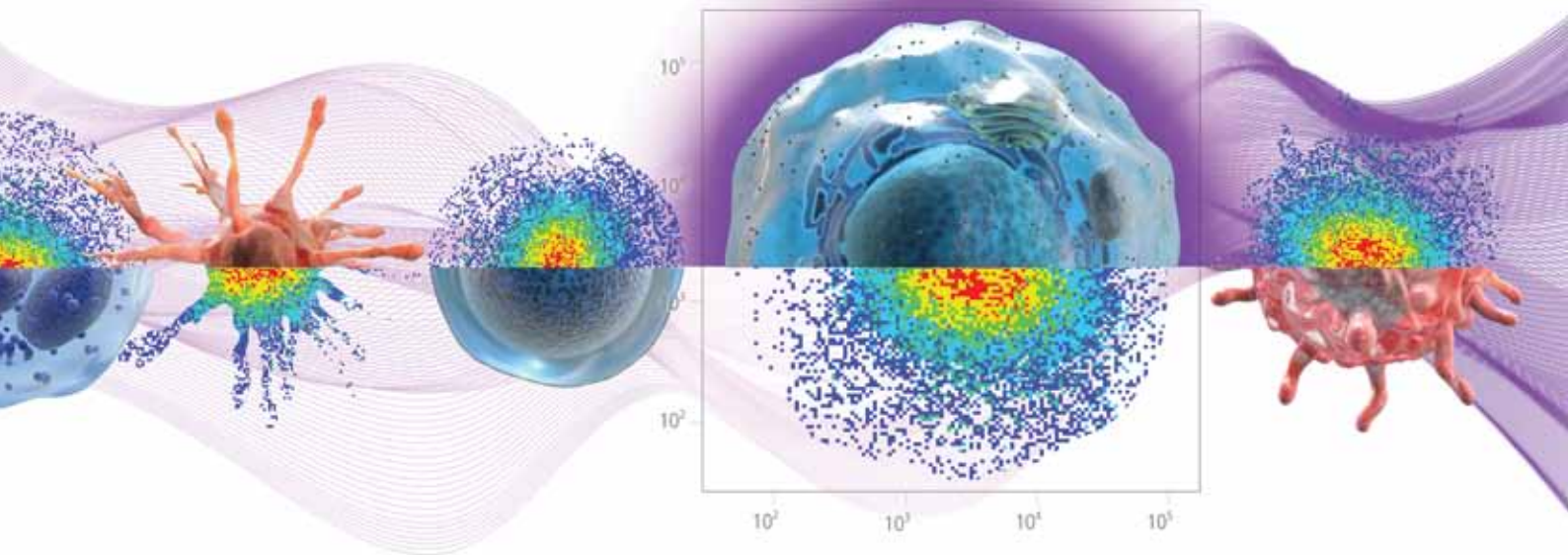
激光	荧光检测器		
	2激光	3激光	4激光
紫色, 405 nm	6	6	6
蓝色, 488 nm	3	3	2
黄色, 561 nm	NA	NA	3
红色, 637 nm	NA	3	3
可用的荧光检测器总数	9	12	14
每种配置的总参数*	11	14	16

*包括前向散射(FSC)和侧向散射(SSC)。

表5. Attune NxT流式细胞仪中紫色激光的6个荧光检测器的荧光染料指南。

检测器	带通滤光片(nm)	荧光染料
VL1	450/40	Super Bright 436, Brilliant Violet 421, eFluor 450, Pacific Blue, BD Horizon™ V450, VioBlue
VL2	525/50	eFluor 506, Brilliant Violet 510, Pacific Green, BD Horizon™ V500, VioGreen
VL3	610/20	Super Bright 600, Brilliant Violet 605, Pacific Orange
VL4	660/20	Super Bright 645, Brilliant Violet 650
VL5	710/50	Super Bright 702, Brilliant Violet 711
VL6	780/60	Brilliant Violet 786

invitrogen



拒绝平庸 — 深入洞察单细胞

利用Invitrogen™ 产品开展您的研究

每个细胞中都有等待揭示的谜团。在Thermo Fisher Scientific，我们致力于提供用于细胞及其功能分析的全套解决方案，以加快您的科学研究并推动有意义的发现。我们的创新性产品包括Invitrogen™ Attune™ NxT声波聚焦流式细胞仪、Invitrogen™ eBioscience™流式细胞抗体和Super Bright流式抗体以及Invitrogen™ 功能试剂。

我们深知在您不断追求突破时，不能只是平庸，我们也同样追求独特创新。

如需了解更多信息，请登录 thermofisher.com/flowcytometry



赛默飞
官方微信



赛默飞
生命科学官方微信

免费服务电话：800 820 8982/400 820 8982
销售服务信箱：sales.china@thermofisher.com
技术咨询信箱：LifeScience-CNTS@thermofisher.com

ThermoFisher
SCIENTIFIC