流式间标法实验步骤

一、 样本准备

（收集细胞：根据你的样本类型（培养细胞、PBMC 或全血）收集细胞）

1：培养细胞/PBMC：收集细胞悬液，计数，在进行间接标记法流式检测时，推荐细胞活力 > 95%，最低一般不应低于 90%。

全血样本：通常使用 EDTA 抗凝全血。如果目标细胞群是淋巴细胞等单个核细胞，可先通过密度梯度离心法分离 PBMC；如果后续使用溶血素处理，也可直接使用全血进行染色。

2：洗涤细胞：用冰冷的 PBS（含 1% BSA 或 FBS）洗涤细胞一次，以去除培养基或血浆成分。离心条件通常为 300-400g，离心 5 分钟。

3：调整浓度：弃上清后，用含 10% FBS（或 1% BSA）和 0.1% 叠氮化钠的冰冷 PBS 重悬细胞，将细胞浓度调整为 1-5 x 10^6 细胞/mL。

★注意：叠氮化钠可以抑制表面抗原的调变和内化，低温操作同理。

二、染色步骤（这是实验的核心环节，需严格控制孵育温度和洗涤质量）

1：加一抗：

取 100 µL 上述细胞悬液（即含有 1-5 x 10^5 个细胞）加入到流式上样管或离心管中。加入适量一抗（参考说明书推荐浓度，可用 PBS 稀释），轻轻混匀。

孵育条件：通常在 4℃ 避光孵育 30 分钟或室温避光孵育 15 分钟。对于一些敏感性抗原，建议 4℃孵育以维持细胞活性和抗原稳定性。如果是全血快速法，室温孵育较常见。

2：洗涤（关键步骤）：

加入 1-2 mL 冰冷的 PBS（含 1% BSA）缓冲液。离心（300-400g，5 分钟），弃上清。尽量吸干残留液体，但避免吸到细胞沉淀。重复洗涤 2-3 次。目的是彻底洗去未结合的一抗，降低背景。

3：加二抗：

根据一抗的宿主来源（如小鼠 IgG），选择合适的荧光素标记的二抗（如羊抗小鼠 IgG（AWS0003，AWS0004））。用含 3% BSA 的 PBS 将二抗稀释至最佳工作浓度（参考说明书），加入到细胞沉淀中，重悬细胞，轻轻混匀。

孵育二抗：通常在 4℃ 避光孵育 30 分钟或室温避光孵育 15 分钟。（关键：从此步开始到上机检测前，细胞务必避光，以防止荧光淬灭。）

4：洗涤（关键步骤）：

加入 1-2 mL 冰冷的 PBS（含 1% BSA），离心（300-400g，5 分钟），弃上清。重复洗涤 2-3 次。此次洗涤是为了去除未结合的游离二抗，减少非特异性荧光。

5：重悬：

加入 100μL 的 PBS（含 1% BSA 或固定液）重悬细胞，准备上机检测。

三、 注意事项

1：固定（如不能立即上机）：

如果染色完成后不能立即上机检测，或者需要灭活样本中的生物危害性，可以进行固定。用 1-2% 多聚甲醛（PFA） 重悬细胞，4℃避光保存。固定后的样本通常建议在 24 小时内检测，且可能影响某些荧光染料的亮度。

间标法由于引入了二抗，背景可能高于直标法，以下措施可以帮助优化结果：

2：设置对照：

必须设置同型对照（使用与一抗同源型的非特异性抗体代替一抗）及空白对照（不加一抗，只加二抗），以评估二抗的非特异性结合。

3：封闭 Fc 受体：

对于表达 Fc 受体的细胞（如巨噬细胞、B 细胞），在加一抗前，先用 5-10% 来自二抗宿主动物的正常血清或 CD16/32 抗体（Fc Block）（AWA06009）进行封闭，孵育条件与一抗相同，此步可有效减少抗体的非特异性结合。

4：使用 $F(ab')_2$片段：

可以考虑使用 $F(ab')_2$的荧光二抗，因为它们缺少 Fc 段，不会与细胞的 Fc 受体结合。