流式细胞术-单克隆细胞分选操作

分选前准备：

1. 细胞准备：含有阳性细胞簇的细胞培养群：如果是荧光分选，等皿中有稳定的不会淬灭的荧光出现后即可进行分选（通常观察时间为1-2周）；如果是耐药分选，通常为开始杀伤后1-2周后进行分选。同时准备没有杀伤/荧光的阴性细胞群。
2. 试剂与仪器：
3. 提前预约流式细胞仪，通常一次分选预约4-5小时。
4. 提前一天以上进行鞘液灭菌（1XPBS，10L，灭菌后需要冷却至常温），如果珍贵样本需要严格无菌，请准备2L DI water同时灭菌作为管道冲洗液。
5. 提前1左右进行硬件开机。
6. 试剂：Accutase溶液，细胞对应的完全培养基，DPBS，HEPES，FBS（经过0.22um滤膜过滤），PI（可选），PS，HBSS
7. 96孔poly-lysine预包被孔板。
8. 配置细胞接收液，分选缓冲液：
9. 分选缓冲液：

淋巴细胞（HBSS配方中的阳离子可增进细胞的生存力。如果这些细胞并非易于群集细胞，可以选用没有EDTA的缓冲液）。

A：1 mM EDTA, 25mM Hepes (pH7.2) and 0.5% - 2% BSA in 1× PBS (without Ca2+ and Mg2+)

B：1× HBSS (without phenol red) with 1% BSA（recommened）

C：0.5% - 2% BSA in PBS (without Ca2+ and Mg2+)

贴壁细胞（以Trypsin处理后去准备单细胞悬浮液时，待细胞变圆（切记不可过度作用），以适量含5%血清培养液收取细胞，并均匀地打散细胞悬浮液。离心后，用分选缓冲液调整细胞浓度。如果需要的话可以提高EDTA的浓度(至5mM)以避免细胞重新黏聚）。

5 mM EDTA, 25mM Hepes (pH7.0) and 0.5% - 2% BSA in 1× PBS (without Ca2+ and Mg2+)

或0.5-2% BSA in PBS(without Ca2+ and Mg2+)

含有高比例死细胞的样本（这些配方可减少因死细胞释放出来的DNA所造成的细胞黏聚现象。）

5mM MgCl2~~, 1 mM EDTA,~~ 25mM Hepes (pH7.2), 25-50μg/mL DNAase I and 0.5% - 2% BSA in 1× PBS (without Ca2+ and Mg2+)

注意：DNase I与EDTA不可以同时使用

如果细胞有形成聚集体的倾向，可以考虑以下修改之一：

使用无钙/镁缓冲液

加入EDTA（2 - 5 mM）

如果细胞制备物诱导细胞裂解增加，则加入25 µg/ml DNase I + 5 mM MgCl2（无EDTA）

在分选缓冲液中加入1% Accutase

1. 接收液：

96孔板分选单克隆：

全培+1X PS +1/5杀伤浓度抗生素（终浓度为2X PS，1/5 Blasticidin S or Puro）

每个孔分配200ul接收液。

在接收细胞前，充分预热培养基（可于培养箱中孵育）

其余群体接收液：

常规完全培养基（注意足量），可增加血清含量。

分选前细胞处理：

使用accutase将细胞轻轻解离成单细胞溶液。

1. 从培养箱中取出组织培养容器并将其放入生物安全柜中。
2. 从容器中吸出培养基，用1 mL室温1 X DPBS（不含Ca2+/Mg 2+）清洗。

注意：该体积指的是6孔板每个孔的或35 mm组织培养皿的体积。

P10 使用2-3ml 1X DPBS清洗。

1. 从上一步中吸出DPBS，并加入1 mL Accutase（p10: 2-3mL），然后将板放回培养箱中5-7分钟。（为了降低细胞损伤，这一步骤可以在室温下进行，孵育时间可以缩短为3-5分钟）

注意：解离所需的时间因细胞系而异，应通过测试来获得最佳活力 (>90%)。

1. 从培养箱中取出培养皿并将其放入生物安全柜中。

注意：此时大多数细胞集落应该已经悬浮。（可以在悬浮前中和，也不影响单细胞形成）

1. 从培养皿底部收集剩余的集落：

a.使用p1000微量移液器吸取细胞悬浮液并将剩余的粘附集落从培养皿中吸出；

b.轻轻地上下吹打两次，将细胞聚集体分离成单个细胞；

c.将细胞混合物转移到15 mL离心管中，然后立即添加9 mL培养基以中和Accutase反应。

以上为accutase推荐操作，实际中，可以在皿中加入2-3Volume的培养基中和轻柔吹打细胞，收集悬液至15mL离心管中预备离心。

6. 在室温下以200-300g离心5分钟，吸出上清液，然后将细胞沉淀轻轻悬浮3-5 mL流式缓冲液中。

7. （可选）使用台盼蓝计数活细胞：如果细胞活力低于80%，请勿继续。

8. 加入流式缓冲液对细胞进行清洗后在室温下以200-300 xg离心5分钟，以完全洗去酚红，将细胞重悬在流式缓冲液中。

9. （可选）加入PI，不孵育，上级过程中实时监测细胞死活。

10. 使用200目无菌滤网进行过滤，避免堵塞流式管道。（Accutase消化成单细胞能力良好，未过滤但充分解离的细胞堵塞流式管道概率很小，但仍推荐过滤网）

11. 对于堵塞可能高的细胞，上机前即时再进行一次过滤。

以上步骤操作完成后，将样品保存在15mL离心管中，4摄氏度保存，降低细胞代谢，即时上机。

Sony MA8000操作：

准备：擦手纸，15mL及50mL离心管，数支流式管，马克笔。

开机前，先检查鞘液，DI water，Waste容量。补充鞘液时，先断气管，再断液管，拉开放气阀，更换鞘液；补充DI water，实验结束后倾倒废液。使用前使用纯水清洁电极板（拆卸后用纯水清洁电极板，使用擦手纸擦拭后再安装复位）。

1. 打开气泵，等待压缩机完全运行后开流式机器，最后打开电脑。压缩机完全开启前禁止打开机器的芯片区。

用户名：user1；密码：password1

1. 打开流式机器，待其稳定后，打开电脑软件MA。
2. 选择扫描芯片，修改日期，扫描芯片二维码，插入芯片，芯片字体面对自己，默认filter setting laser setting，等待校验。
3. 使用流式微球进行校准（10滴），选择自动校准，standard模式。15-20分钟完成。
4. 建立实验，勾选荧光染料，选择通道。开始实验。
5. 圈门调整时，detector setting，threshold不改，调整FSC和BSC电压。调节阳性群体电压，使阴性对照组信号强度在10-3以内，阳性组没有超出最高信号的群体。
6. 分选实验连续进行2h后，需要进行冲洗。堵管时，进行sample line cleaning，先用bleach，再用纯水。
7. 实验结束，使用15mL管装12mL Bleach进行标准冲洗，先上管子再开始shutdown，否则abolish会非常久。Bleach标准冲洗结束后使用DI water冲洗，关机，最后关闭气泵。

单克隆细胞挑选完成后，迅速将96孔板放回细胞孵箱，约6-7天后，可在孔内观察到单细胞扩增形成的集落，约10-20个细胞，约12-14天后，可以观察到明显的细胞群落，数量充足，吸去培液后肉眼可见细胞团，此时可以消化后进行单克隆扩增。

单克隆转移与扩增：

使用Accutase进行消化，可使用50-100ul/well进行消化，待细胞充分消化（室温5-7分钟）后，使用足量全培进行中和以及细胞转移，收集液可于1.5m EP管内进行离心，使用全培重悬，于24/12孔板内培养，随后扩增至6孔板-中皿-大皿。