



碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology
订货热线: 400-1683301 或 800-8283301
订货 e-mail: order@beyotime.com
技术咨询: info@beyotime.com
网址: http://www.beyotime.com

BeyoFC™ AF647 anti-human CD154 Antibody

产品编号	产品名称	包装
AC0477-125μl	BeyoFC™ AF647 anti-human CD154 Antibody	50次
AC0477-500μl	BeyoFC™ AF647 anti-human CD154 Antibody	200次

产品简介:

来源	Isotype	用途	交叉反应性	标记	Ex/Em
Mouse	IgG1	FC	Human	AF647	650/671nm

注: 推荐用于流式细胞仪检测每次用量为2.5μl, 对应 $2.5-5 \times 10^5$ 细胞或50μl外周血, 实际使用时可以根据样品的实际情况适当调整抗体用量。

- 碧云天的BeyoFC™系列抗体, 也称BeyoFC™流式抗体(Antibody for flow cytometry, FC antibody), 是经过充分验证适用于流式细胞仪(Flow Cytometry, FC)的高品质抗体, BeyoFC™系列流式抗体提供很多常见抗体, 并提供多种荧光标记, 便于选择合适的抗体和适当的荧光标记。
- BeyoFC™系列流式抗体对于细胞的标记效果好, 染色背景低, 细胞分群更清晰。
- BeyoFC™系列流式抗体特异性高, 染色和细胞分群结果更为准确。
- BeyoFC™系列流式抗体一致性好, 批次间差异更小, 结果重复性好。
- 抗体详细信息如下:

About this Antibody	
Name	BeyoFC™ AC0477 Antibody
Category	Mouse Monoclonal Antibody (mAb); Primary antibody; FC Antibody
Isotype	IgG1
Clone number	BYM91
Purification method	Protein A affinity purification
About the Immunogen	
Gene ID	959
Swiss Prot	P29965
Synonyms	IGM; IMD3; TRAP; gp39; CD154; CD40L; HIGM1; T-BAM; TNFSF5; hCD40L
Background	The protein encoded by this gene is expressed on the surface of T cells. It regulates B cell function by engaging CD40 on the B cell surface. A defect in this gene results in an inability to undergo immunoglobulin class switch and is associated with hyper-IgM syndrome. [provided by RefSeq, Jul 2008]

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
AC0477-125μl	BeyoFC™ AF647 anti-human CD154 Antibody	125μl
AFC060	BeyoFC™流式检测细胞染色缓冲液	60ml
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
AC0477-500μl	BeyoFC™ AF647 anti-human CD154 Antibody	500μl
AFC250	BeyoFC™流式检测细胞染色缓冲液	250ml
—	说明书	1份

保存条件：

4℃保存，一年有效。抗体须避光保存。BeyoFC™流式检测细胞染色缓冲液-20℃可以保存更长时间。

注意事项：

- 流式抗体通常不宜回收再使用。
- 相关步骤离心时，4℃可更好的维持细胞完整性；同时根据细胞类型，可对离心力进行一定的优化。
- 如果需要同时进行细胞表面和细胞内抗原的流式检测，须先进行细胞表面抗原的染色，这样可以避免有些细胞表面抗原因为固定而无法被流式抗体所识别。
- 如需更多的BeyoFC™流式检测细胞染色缓冲液，可以另行单独采购BeyoFC™流式检测细胞染色缓冲液(C1711)。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明：

如下实验步骤仅供参考。用于特定样品分析的时候，可尝试使用实验室习惯方法或根据实验目的进行实验条件的适当优化。

1. **实验方案设计。**根据实验目的，根据拟使用的流式细胞仪的光学性能，选择合适的荧光标记抗体和染色液，确定多荧光染色方案。为了确保实验结果的可信度和准确性，建议适当设置如下实验分组。

Experiment design	Purpose
阴性/空白对照	调节仪器电压
单染/单阳性对照	调节补偿
抗体同型对照	消除背景染色干扰
FMO (荧光扣除)对照	确定设门的准确性
生物学对照	与实验组进行对比
实验组	获取实验结果

2. **单细胞悬液样品的准备。**采集组织或细胞样品，使用适当方法制备成单细胞悬液，并使用BeyoFC™流式检测细胞染色缓冲液重悬细胞，细胞密度宜为 $5-10 \times 10^6$ 细胞/ml，体积为50μl。

注1：须根据样品的特性选择合适的方法将样品制备为单细胞悬液。例如，脾脏、淋巴结、胸腺、骨髓、肿瘤等实体组织样品和贴壁细胞需要适当消化处理成单细胞混悬液；外周血需要去除红细胞，推荐使用红细胞裂解液(C3702)。

注2：如果使用胰酶等蛋白酶消化贴壁细胞样品，须充分洗涤以去除残留的消化酶，以免干扰后续的抗体与细胞表面抗原的结合。

注3：通常可以在 $350 \times g$ 离心5分钟以沉淀细胞。但对于不同的细胞，也可以酌情采用 $150-350 \times g$ 离心1-10分钟。

- a. 外周血单核细胞(PBMC)的样品制备：

- (a) 采集的血液采用抗凝管(EDTA、肝素抗凝管均可)分装，用不含钙镁离子的PBS或生理盐水对样品进行1:1稀释，推荐选择碧云天生产的PBS (C0221A)或生理盐水(0.9% NaCl, 无菌) (ST341)。
- (b) 根据需要选择对应的外周血分离试剂盒，并按照对应的操作说明进行PBMC的分离。推荐使用碧云天人外周血淋巴细胞分离液(C0025)、大鼠外周血淋巴细胞分离试剂盒(C0027)、小鼠外周血淋巴细胞分离试剂盒(C0029)、兔外周血淋巴细胞分离试剂盒(C0031)。
- (c) 提取PBMC后，用适量BeyoFC™流式检测细胞染色缓冲液重悬细胞， $250 \times g$ 离心10分钟，弃上清。再次用适量BeyoFC™流式检测细胞染色缓冲液重悬细胞后，对细胞进行计数及活性检测。随后，根据计数的结果调整细胞浓度至 $5-10 \times 10^6$ 个细胞/ml，取50μl (约 $2.5-5 \times 10^5$ 个细胞)置于4℃或冰浴备用。

注：EDTA抗凝剂可使粒细胞脱粒，过量肝素钠将导致白细胞和血小板聚集,如果是细胞因子或凋亡检测，须使用肝素抗凝。

- b. 贴壁细胞的样品制备：

- (a) 用EDTA细胞解离液将细胞从培养器皿中解离下来。推荐使用BeyoAOF™ 0.02% EDTA细胞解离液(Versene溶液) (C0198)。也可以酌情使用胰酶细胞消化液，但胰酶消化可能会影响后续细胞表面抗原的检测。EDTA细胞解离液处理后，如有必要可以使用细胞铲或细胞刮促进细胞解离。推荐使用BeyoGold™ 21cm细胞铲(独立纸塑包装，无菌) (FLFT021)、BeyoGold™ 23cm细胞刮(独立纸塑包装，无菌) (FSCP023)或BeyoGold™ 29cm细胞刮(独立纸塑包装，无菌) (FSCP029)。
- (b) 将细胞转移至离心管中，并使用移液器轻柔吹打数次，以充分分散细胞团块，然后进行细胞计数和活性检测。
- (c) 根据具体的细胞类型选择合适的转速离心获得细胞沉淀，然后用适量体积的BeyoFC™流式检测细胞染色缓冲液重悬细胞，调整细胞浓度为 $5-10 \times 10^6$ 个细胞/ml，取50μl (约 $2.5-5 \times 10^5$ 个细胞)置于4℃或冰浴备用。

- c. 淋巴组织的样品制备：

- (a) 向细胞培养皿中倒入约20ml预冷的PBS缓冲液，将一个70μm孔径的细胞过滤器(或200目滤网)置于培养皿中，润湿底部。推荐使用碧云天BeyoGold™细胞过滤器(70μm孔径，底网，独立包装，无菌) (FSTR072)或BeyoGold™细胞过滤器(70μm孔径，独立纸塑包装，无菌) (FSTR070)。
- (b) 采集组织(脾、胸腺或淋巴结)将其放入细胞过滤器中，使用5ml注射器柱塞端压向细胞过滤器轻轻研磨组织，直至组织中细胞完全分离，只剩白色膜状物残留在细胞过滤器上。推荐选购一次性实验用注射器(无菌独立包装，带针，5ml) (FS805)。
- (c) 将70μm细胞过滤器放在50ml离心管上方，使用一次性移液器，将研磨后的细胞悬液转移到细胞过滤器中。加入5-10ml预冷的PBS冲洗筛网，如有未研磨完全的组织团块，可继续使用5ml注射器柱塞端进行研磨，边研磨边加入适量预冷的PBS

冲洗细胞过滤器。收集所有细胞滤液后，4°C，350×g离心5分钟，弃上清。

(d) 加入适量BeyoFC™流式检测细胞染色缓冲液重悬细胞，随后4°C，350×g离心5分钟，弃上清。

(e) (选做)裂解红细胞：加入6-8ml红细胞裂解液，充分重悬后室温孵育3-5分钟进行红细胞裂解。然后加入等体积的BeyoFC™流式检测细胞染色缓冲液终止裂解，350×g离心5分钟，弃上清。推荐使用红细胞裂解液(C3702)。

注：如果红细胞的存在不影响后续实验，可省略本步骤。

(f) 加入2ml BeyoFC™流式检测细胞染色缓冲液重悬细胞，10倍稀释后进行细胞计数和活性检测。随后根据计数的结果调整细胞浓度至5-10×10⁶个细胞/ml，取50μl (约2.5-5×10⁵个细胞)置于4°C或冰浴备用。

注：可以酌情选购BeyoFC™小鼠脾脏单细胞悬液制备试剂盒(C1758)以用于制备相应的单细胞悬液。

3. (选做)Fc受体封闭。巨噬细胞、单核细胞、粒细胞、B细胞、树突状细胞等细胞表面表达Fc受体，会与抗体的Fc段结合，从而影响预期的实验结果。为了减少这种非预期的染色，推荐使用Fc受体封闭剂。通常人的巨噬细胞、单核细胞等表达Fc受体水平较高，会与兔IgG发生较明显的交叉反应，此时更宜进行Fc受体封闭。

a. 对于人样品，推荐使用BeyoFC™ FcR封闭剂(Human) (C1752);对于小鼠样品，推荐使用碧云天的BeyoFC™ FcR封闭剂(Anti-mouse CD16/CD32) (C1755)。

b. 取2.5-5×10⁵个细胞(50μl细胞悬液)至15ml离心管或流式细胞管(FFC005)中，体积不足50μl的用BeyoFC™流式检测细胞染色缓冲液补足至50μl。按照对应的说明书添加适量的Fc封闭剂，冰上孵育5-10分钟。完成后无需洗涤，立即加入拟检测的目标蛋白的抗体进行后续的染色。

注：宜将吸头插入至离心管或流式细胞管近底部后，再加入细胞悬液，尽量避免从管侧壁加样，以减少细胞样品可能的损失。

4. 细胞表面抗原的流式抗体染色。

a. 每管加入2.5μl本产品，用移液器轻轻吹打混匀，4°C或冰浴避光孵育15-30分钟。

注1：对于25-50万个细胞，推荐使用2.5μl本产品。其它细胞数量，可以适当增减用量。对于特定的样品，可以根据实验结果对于用量进行一定的优化。

注2：对于特定的样品，如果染色偏弱，也可以酌情把细胞与抗体的孵育时间延长至60分钟。

b. 每管加入0.5ml BeyoFC™流式检测细胞染色缓冲液并混匀，350×g离心5分钟，弃上清。

c. 重复一次上述步骤b一次。

d. (选做)将细胞重悬于100μl BeyoFC™流式检测细胞染色缓冲液，酌情加入7-AAD或碘化丙啶(PI)染色液用于染色死细胞，以排除死细胞对实验结果的干扰。推荐选购碧云天的BeyoFC™ 7-AAD染色液(50X) (C1737)或BeyoFC™ PI染色液(50X) (C1734)。

注1：在样品制备的过程中，特别是组织样品，常常有较多死细胞，会影响流式分析结果。此时如果使用7-AAD或PI染色，可以区分死细胞和活细胞，能有效去除死细胞对实验结果的干扰。但7-AAD等核酸染料通常与细胞固定及胞内染色步骤不兼容，如果实验涉及到固定及胞内染色，则需使用可兼容固定步骤的胺反应性染料，并在表面染色开始前进行死细胞染色。

注2：如果使用的一抗是非荧光标记的，洗涤步骤结束后，可以重悬至100μl BeyoFC™流式检测细胞染色缓冲液中，并加入适量的荧光标记二抗，4°C或冰浴避光孵育15-30分钟。随后每管加入0.5ml BeyoFC™流式检测细胞染色缓冲液并混匀，350×g离心5分钟，弃上清。随后再重复洗涤步骤1次。

注3：如果后续无细胞内抗原染色，本步骤结束后即可使用流式细胞仪进行流式细胞分选(Fluorescence activated cell sorting, FACS)或流式细胞分析。

5. 细胞内抗原的流式抗体染色。如果进行细胞内抗原的流式细胞抗体染色，请优先进行细胞表面抗原的流式抗体染色，这样可以避免有些细胞表面抗原因为固定而无法被流式抗体所识别。

a. 固定。上述细胞悬液350×g离心5分钟后，弃上清。加入500μl BeyoFC™流式检测细胞固定液(C1713)或4%多聚甲醛固定液(P0099)，室温避光孵育10-20分钟以固定细胞。350×g离心5分钟，弃上清。

注1：在进行细胞内抗原染色前须固定细胞，以确保可溶性抗原或半衰期短的抗原的稳定性。

注2：进行细胞内抗原的流式抗体染色时需充分考虑靶点抗原在细胞内的位置，从而选择合适的固定方式。如细胞骨架抗原、病毒抗原和某些酶抗原通常在用高浓度丙酮、酒精或甲醛固定时获得最佳效果。但一些有机溶剂处理时可能会导致荧光基团的淬灭，例如使用甲醇处理会导致PE或APC的荧光无法被清晰观察到。

b. 通透与洗涤。加入2ml BeyoFC™流式检测细胞通透与洗涤液(Triton X-100) (C1715)或BeyoFC™流式检测细胞通透与洗涤液(Saponin) (C1717)充分重悬细胞，在室温下避光孵育10-15分钟以通透细胞。350×g离心5分钟，弃上清。重复洗涤2-3次。

注1：可根据靶点抗原在细胞内的具体位置，选择适当的不同强度的通透与洗涤试剂。

注2：碧云天同时提供BeyoFC™流式检测细胞固定与通透缓冲液(C1719)，仅需一步即可同时实现固定及通透步骤，如需获取可点击相关产品或查询网站。

c. 重悬。每管加入100μl BeyoFC™流式检测细胞染色缓冲液重悬细胞。

d. 染色。可以参考常规的免疫荧光染色步骤进行。加入荧光标记的适当抗体并适当混匀，室温避光孵育15-30分钟(也可以酌情调整为室温避光孵育30-60分钟)。每管加入2ml BeyoFC™流式检测细胞通透与洗涤液(Triton X-100) (C1715)或BeyoFC™流式检测细胞通透与洗涤液(Saponin) (C1717)并混匀，350×g离心5分钟，弃上清。随后再重复洗涤一次。最终用100μl BeyoFC™流式检测细胞染色缓冲液重悬细胞。

注：如果使用的一抗是非荧光标记的，洗涤步骤结束后，可以用100μl BeyoFC™流式检测细胞染色缓冲液重悬，并加入适量的荧光标记二抗，4°C或冰浴避光孵育15-30分钟(也可以酌情调整为室温避光孵育30-60分钟)。随后每管加入2ml BeyoFC™流式检测细胞通透与洗涤液(Triton X-100) (C1715)或BeyoFC™流式检测细胞通透与洗涤液(Saponin) (C1717)并混匀，350×g离心5分钟，弃上清。随后再重复洗涤步骤1次。最终用100μl BeyoFC™流式检测细胞染色缓冲液重悬细胞。

6. 流式细胞仪检测和分析。

上述各种染色请注意尽量设置好各种阴性和阳性对照。如有必要，可以设置相同标记的同型抗体阴性对照。根据空白对照和单阳性对照，适当调整光电倍增管电压(PTM voltage)和补偿。根据未染色的空白对照、Isotype control、阳性对照等进行象限分析(Quadrant analysis)。同时根据前向散射和侧向散射的检测结果，去除散射明显偏小的细胞碎片和散射明显偏大的双细胞和多细胞，圈选散射适中的单细胞进行后续的分析。如果使用了7-AAD或PI进行染色，可以根据需要筛选出染色阴性的活细胞进行后续分析。具体的实验操作请自行参考适当的特定流式细胞仪的使用说明进行。

7. 本抗体用于流式细胞分析的代表性图片请参考图1。

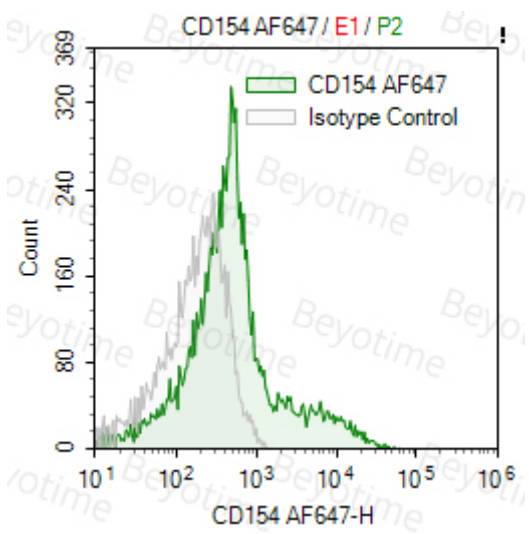


图1. 碧云天AF647 anti-human CD154 (AC0477)检测效果图。Intracellular Cell Stimulation Cocktail -stimulated human PBMCs (4hours) stained with AF647 anti-human CD154 (clone BYM91) (colored histogram) or AF647 mouse IgG1 (gray histogram).

参考文献：

1. Maciorowski Z, Chattopadhyay PK, Jain P. Curr Protoc Immunol. 2017;117:5.4.1-5.4.38.
2. Cossarizza A et al. (2019). Eur J Immunol 49, 1,457–1,973.
3. Ferrer-Font L et al. (2020). Curr Protoc Cytom, 92, 1, e70.

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
FFC005-1bag	BeyoGold™流式细胞管(5ml, 透明, 无菌)	25个/袋
FFC005-20bags	BeyoGold™流式细胞管(5ml, 透明, 无菌)	25个/袋, 20袋/箱
C0025-200ml	人外周血淋巴细胞分离液	200ml
C0027S	大鼠外周血淋巴细胞分离试剂盒	200ml
C0029S	小鼠外周血淋巴细胞分离试剂盒	200ml
C0031S	兔外周血淋巴细胞分离试剂盒	200ml
C0071	BeyoClick™ EdU-488细胞增殖检测试剂盒	50-500次/200-2000次
C0075	BeyoClick™ EdU-555细胞增殖检测试剂盒	50-500次/200-2000次
C0078	BeyoClick™ EdU-594细胞增殖检测试剂盒	50-500次/200-2000次
C0081	BeyoClick™ EdU-647细胞增殖检测试剂盒	50-500次/200-2000次
C1052	细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒	50次
C1053	7-AAD细胞活力检测试剂盒	200次/1000次
C1055	一步法细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒	50次/200次
C1062	Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒	20次/50次/100次
C1065	Annexin V-PE细胞凋亡检测试剂盒	20次/50次/100次
C1067	Annexin V-EGFP细胞凋亡检测试剂盒	20次/50次
C1069	Annexin V-mCherry细胞凋亡检测试剂盒	20次/50次/100次
C1070	Annexin V-mCherry/SYTOX Green细胞凋亡检测试剂盒	20次/50次
C1711	BeyoFC™流式检测细胞染色缓冲液	100ml/500ml
C1713	BeyoFC™流式检测细胞固定液	100ml/500ml
C1715	BeyoFC™流式检测细胞通透与洗涤液(Triton X-100)	100ml/500ml
C1717	BeyoFC™流式检测细胞通透与洗涤液(Saponin)	100ml/500ml

C1719	BeyoFC™流式检测细胞固定与通透缓冲液	100ml
C1731	BeyoFC™ PI/RNase即用型染色液	100ml
C1734	BeyoFC™ PI染色液(50X)	0.5ml/2ml
C1737	BeyoFC™ 7-AAD染色液(50X)	1ml/5ml
C1740	BeyoFC™ Foxp3/转录因子破膜试剂盒	150次
C1743	BeyoFC™固定与通透试剂盒	200次
C1746	BeyoFC™ Plus固定与通透试剂盒(含阻断剂Monensin)	200次
C1749	BeyoFC™ Plus固定与通透试剂盒(含阻断剂BFA)	200次
C1752	BeyoFC™ FcR封闭剂(Human)	50次/200次
C1755	BeyoFC™ FcR封闭剂(Anti-mouse CD16/CD32)	50次/200次
C1758	BeyoFC™小鼠脾脏单细胞悬液制备试剂盒	20次/100次
C3702	红细胞裂解液	120ml/500ml

Version 2025.03.10