

### Extracelulární (povrchové) značení

- Nasazené buňky 2x promýt 200 $\mu$ l PBS (500-600g, 2min., 4°C)
- V případě použití purifikovaných protilátek
  - o Blokovat sérem (stejný druh jako buňky = myš myší, atd.): 100 $\mu$ l na jamku, 10min., 4°C.
  - o 2x promýt 200 $\mu$ l PBS, nanést 10 $\mu$ l purifikované protilátky a inkubovat 30min., 4°C.
  - o 2x promýt 200 $\mu$ l PBS, blokovat sérem (z druhu který byl použit pro výrobu sekundární protilátky): 100 $\mu$ l na jamku, 10min., 4°C.
  - o 2x promýt 200 $\mu$ l PBS, nanést 10 $\mu$ l sekundární (značené) protilátky a inkubovat 25 min., 4°C, ve tmě. 2x promýt 200 $\mu$ l PBS a dále pokračovat se značenými a biotinylovanými Abs.
- Nanést 10 $\mu$ l primárních protilátek (případně mixů = všechny barvy plus biotynilované protilátky) a inkubovat 30 min., 4°C, ve tmě.
- 2x promýt 200 $\mu$ l PBS.
- Nanést 10 $\mu$ l ředěných sekundárních protilátek (většinou jen streptavidin s konjugátem) a inkubovat 25 min., 4°C, ve tmě, poté 2x promýt 200 $\mu$ l PBS.
- V případě dalšího intracelulárního značení viz. protokol Intracelulární značení.
- Resuspendovat v požadovaném množství PBS (50-100 $\mu$ l) a případně přenést do mikrozkuvek (při nevyužití LSR II - HTS).