

## Treg细胞扩增试剂盒，小鼠(92-01-0124)

**[组分]** 2 mL CD3/CD28 磁珠颗粒，细胞培养级。

**[规格]** 2ml。

**[保存形式]** 所有组分均不含叠氮钠，但包含稳定剂。

**[储存条件]** 在 2–8°C 条件下避光保存，请勿冻存。有效期见试剂外标签。

### [原理]

Treg 扩增试剂盒功能是基于 CD3 和 CD28 抗体的磁珠颗粒实现的。Treg 细胞的最佳扩增效果是通过使用磁珠颗粒和 Treg 细胞（磁珠珠与细胞比为 3:1）和浓度为 2000 U/mL 的 IL-2 共刺激来实现的。

### [试剂和设备]

● 培养基：含有稳定谷氨酰胺的 RPMI 1640，辅以 10%胎牛血清 (FBS)、1%丙酮酸钠、10 mM HEPES 和 2000 U/mL IL-2。

▲ 注：可添加 2-巯基乙醇 (0.01 mM)，在细胞快速生长时保持细胞活力。

● （可选）CD4+CD25+调节性 T 细胞分选试剂盒，小鼠。

● IL-2

● 细胞培养箱。

● 96 孔板。

● （可选）磁珠分离器，用于在 Treg 细胞扩增后、下游实验之前去除磁珠颗粒。

● （可选）用于 Treg 细胞流式细胞术分析的荧光染料偶联抗体。

### [1.样本制备]

当使用抗凝外周血或白膜层时，应通过密度梯度离心分离 PBMC。

▲ 注意：要在密度梯度分离后去除血小板，请将细胞沉淀重悬于缓冲液中，并在 20°C 下以 200×g 离心 10–15 分钟。小心吸出上清液。重复洗涤步骤。

当处理组织或溶解的血液时，使用标准方法制备单细胞悬浮液。

▲注：死亡细胞可能非特异性地结合到磁珠上。要去除死细胞，我们建议使用密度梯度离心法或死细胞去除试剂盒。

## [2. CD3/CD28 磁珠颗粒的制备]

1. 重悬 CD3/CD28 磁珠颗粒，并取 50 μL 加至合适的试管中。
2. 添加 300–600 μL 培养基，300×g 离心 5 分钟。完全吸出上清液。
3. 将 CD3/CD28 磁珠颗粒重悬于 500 μL 培养基中（浓度为  $6 \times 10^6$  磁珠/mL）。该试剂即可使用。

▲ 注：Treg 扩增试剂盒的使用 CD3/CD28 磁珠颗粒浓度为  $6 \times 10^7$  磁珠/mL。

## [3. 细胞制备和扩增]

▲ 首先使用 CD4+CD25+调节性 T 细胞分选试剂盒，小鼠分选 Treg 细胞。

1. 测定 Treg 细胞的浓度和总数。每孔需要  $1 \times 10^5$  个细胞。
2. 将所需体积的细胞悬液转移至合适的管中。
3. 向细胞中加入 5–10 倍体积的培养基，并以 300×g 离心 10 分钟。完全吸出上清液。
4. 用（含 2000U/mL IL-2）的培养基重悬细胞，细胞浓度  $2 \times 10^6$  个/mL。取 50 μL 转移到 96 孔板的孔中（第 0 天）。
5. 在每个孔中添加 50 μL CD3/CD28 磁珠颗粒。
6. 在第 1 天，添加 100 μL 培养基（含 2000 U/mL IL-2）。
7. 在第 3–5 天，根据培养基使用情况，吸出 100 μL 培养基并添 100 μL 新鲜培养基（包含 2000 U/mL IL-2）。
8. 可重复刺激。

## [4. 重复刺激 Treg 细胞]

▲ 培养 6–7 天后重新刺激 Treg 细胞，可以先去除 CD3/CD28 磁珠颗粒。

▲ 注意：重复刺激时磁珠与细胞的比例 1: 1。

请按照步骤 3 细胞制备和扩增部分中的程序 1-7 进行操作。还可以在 96 孔板中以以每个 Treg 细胞一个 CD3/CD28 磁珠颗粒的比例进行重复刺激。

### [5. 去除磁珠颗粒]

▲ 在使用磁珠分选细胞之前或在使用不同试剂或抗原重复刺激之前，可能需要去除磁珠颗粒。

1. 收获细胞并转移至 5 mL、15 mL 或 50 mL 管中，并用缓冲液洗涤一次。
2. 将细胞以每 1 mL  $2 \times 10^7$  个细胞的密度重悬于缓冲液中，并彻底涡旋。
3. 将试管置于磁珠分离器的磁场中。

▲ 注意：使用管架将 5 mL 管插入分离器的磁场中。

4. 让磁珠颗粒粘附在试管壁上：

5 mL 管：	2 分钟
15 mL 管或 50 mL 管：	4 分钟

5. 将管子保留在磁铁中，小心除去含有磁珠标记细胞的上清液，并放入新管中。
6. 从分离器中取出管子，并添加缓冲液至与之前相同的体积。
7. 涡旋样品，更换磁珠分离器中的管子并重复步骤 4-5。
8. 现在可以根据需要进一步处理收集的细胞。