

IFN- γ 分泌富集和检测试剂盒 (PE), 人(92-01-0272)

[组分] 1 mL IFN- γ Catch Reagent: 抗 IFN- γ 单克隆抗体 (同种型: 小鼠 IgG1) 与细胞表面特异性单克隆抗体 (同种型: 小鼠 IgG2a) 偶联。

1 mL IFN- γ 检测抗体: 与 PE (R-藻红蛋白偶联的抗 IFN- γ 单克隆抗体 (同种型: 小鼠 IgG1))。

1 mL 抗 PE 磁珠超纯级别: 磁珠与鼠抗 PE 单抗 (同型: 小鼠 IgG1) 偶联。

[规格] 50 次检测, 总计 10^7 细胞数。

[保存形式] 所有组分均保存在含有稳定剂和 0.05% 叠氮钠的溶液中。

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

[检测原理]

使用干扰素- γ 分泌检测试剂盒从全血、外周血单个核细胞(PBMC)或其他含有单细胞制剂的白细胞中分析和分离抗原特异性 T 细胞。用多克隆刺激物或特定的多肽、蛋白质或其他蛋白质抗原制剂, 例如来自白色念珠菌的多克隆刺激物或其他蛋白质抗原制剂, 短时间内对细胞进行再刺激。随后, 将干扰素- γ 特异性捕捉剂附着到所有白细胞的细胞表面。然后将这些细胞在 37°C 下培养一小段时间, 以允许细胞因子的分泌。分泌的干扰素- γ 结合于阳性分泌细胞上的干扰素- γ 捕捉剂。随后用第二种干扰素- γ 特异性抗体: 干扰素- γ 检测抗体与 R-藻红蛋白(PE)偶联, 标记这些细胞, 用于流式细胞仪的灵敏检测。

分泌干扰素- γ 的细胞可以用超纯的抗 PE 磁珠进行磁性标记, 并在分选柱上进行浓缩。磁性标记的细胞保留在分选柱中, 而未标记的细胞穿过。在柱从磁场中移除后, 磁性标记的细胞可以被洗脱为阳性选择的细胞部分, 富含分泌细胞因子的细胞。这些细胞现在可以用于细胞培养或分析。由于对活细胞进行了分析, 因此可以通过排除死细胞来最小化非特异性背景。这提高了的分析灵敏度。

[试剂和设备]

- 缓冲液: 含有 pH7.2、0.5%BSA 和 2mM EDTA 的溶液。

- 选择合适的分选柱和分选器，也可以使用自动分选器进行操作。
- 培养基如 RPMI1640，含 5%人血清(不要使用 BSA 或 FBS，因为有非特异性刺激)
- (可选)用于流式细胞术分析的荧光标记抗体。
- (可选)碘化丙啶溶液或 7-AAD 用于流式细胞术排除死亡细胞。
- (可选)细胞刺激剂，例如，PepTivator®多肽库，用于重新刺激人 T 细胞。
- (可选)预分离过滤器(30 μ m)以去除细胞团。
- 旋转混匀仪。

[1.实验设置]

【1.1 对照品】

阴性对照：为了准确检测分泌 IFN- γ 抗原特异性细胞，应始终包含阴性对照样品。由于持续的体内免疫反应，除了添加抗原或使用对照抗原之外，对照样品的处理方法应与抗原刺激样品完全相同。

阳性对照：当建立新的实验时，建议设定阳性对照。以超抗原葡萄球菌肠毒素 B 1 μ g/mL 刺激 3–16 小时作为阳性对照。

▲注意：不推荐用有丝分裂原刺激阳性对照，因为由此产生的高频率的干扰素- γ 分泌细胞不能对干扰素- γ 分泌试验的表现(例如敏感性)得出结论。

【1.2 再刺激动力学和推荐时间】

肽：用肽刺激后，3-6 小时后可分析细胞的 IFN- γ 分泌情况。可以先准备细胞并将其培养过夜，但不添加抗原（参见 2.2 步骤 2）。然后第二天早上添加肽刺激 3 小时，然后直接进行 IFN- γ 分泌测定。

蛋白质：在用蛋白质抗原制剂（例如白色念珠菌）刺激后，可在 6-16 小时后分析细胞的 IFN- γ 分泌情况。可以在下午早些时候开始刺激细胞，并在第二天早上进行 IFN- γ 分泌测定。

共刺激：添加 CD28 或 CD49d 抗体等共刺激剂可以增强对抗原的反应。如果将共刺激剂添加到抗原样品中，则它们也必须包含在对照样品中。

【1.3 复染分泌细胞】

用 PE 标记的干扰素- γ 检测抗体对干扰素- γ 分泌细胞进行染色。建议用 CD4-FITC 或 CD8-FITC 对 T 细胞进行复染。

▲ 请勿使用 PE 偶联。它们也可能被 超纯抗 PE 磁珠识别。

▲ T 细胞激活后，TCR 和一些相关分子（如 CD3）可能会表达下调。

▲ 在采集前，样品应使用碘化丙啶 (PI) 或 7-AAD 进行染色，以排除分析中的死细胞。这将减少非特异性背景染色并提高灵敏度。

▲ 为了获得最佳灵敏度，我们建议使用与多甲素叶绿素蛋白 (PerCP) 偶联的抗体（例如 CD14-PerCP) 标记不需要的非 T 细胞（例如单核细胞）。然后通过门控将这些细胞与 PI 染色的死细胞一起排除。

【1.4 双色细胞因子分析】

通过将 IFN- γ 分泌检测试剂盒与 IL-2 分泌检测试剂盒 (APC) 或者 IL-10 分泌检测试剂盒 (APC)相结合，通过两种颜色细胞因子分析，可以同时分析分泌干扰素- γ 的细胞产生 IL-2 或 IL-10。

【1.5 与肽-MHC 四聚体染色组合】

通过将 IFN- γ 分泌检测试剂盒 (PE) 与 APC 偶联的肽-MHC 四聚体相结合，可以同时分析 IFN- γ 分泌细胞的肽-MHC 四聚体。与 PE 偶联肽-MHC 四聚体组合，可以使用 IFN- γ 分泌检测试剂盒 (APC)和 IFN- γ 分泌检测试剂盒 (FITC)可用。

【1.6 无需富集即可检测】

(可选) 如果样品中含有超过 0.01–0.1% 的 IFN- γ 分泌细胞，您也许无需事先富集即可分析 IFN- γ 分泌细胞，该测定也可以直接从全血开始进行。

[2. IFN- γ 分泌测定实验方案]

【2.1 细胞制备】

对于细胞因子分泌细胞的检测和分离，通过使用新鲜的 PBMC 或其他含有来自组织或细胞系的单细胞制剂的白细胞开始检测，可获得最佳结果。或者，可以使用冷冻细胞制剂。

▲ PBMC 最好过夜保存。应按照 2.2 步骤 2 中所述将细胞重悬并在培养基中孵育，但不添加抗原。然后第二天将抗原添加到培养物中。

▲ 密度梯度分离后去除血小板。加缓冲液重悬细胞沉淀，在 20 °C 下以 200×g 离心 10-15 分钟。小心地除去上清液。

【2.2 体外刺激】

对于细胞因子分泌细胞的检测和分离，通过使用新鲜的 PBMC 或其他含有来自组织或细胞系的单细胞制剂的白细胞开始检测，可获得最佳结果。或者，可以使用冷冻细胞制剂

▲ 实验中始终包含阴性对照，还可以设置阳性对照。

▲ 请勿使用含有任何非人类蛋白质（例如 BSA 或 FBS）的培养基，因为它们会导致非特异性刺激。

1. 加入培养基洗涤细胞，300×g 离心 10 分钟。

2. 将细胞重悬于培养基中，例如含有 5% 人血清的 RPMI 1640，调整细胞浓度至 10^7 个细胞/mL、 5×10^6 个细胞/cm²。

3. 添加抗原或对照品：

CytoStim: 37 °C、5-7% CO₂ 下 4-6 小时，20 μL/mL

肽: 37 °C、5-7% CO₂ 下 3-6 小时，1-10 μg/mL

蛋白质: 37 °C、5-7% CO₂ 下 6-16 小时，10 μg/mL

SEB: 37 °C、5-7% CO₂ 下 3-16 小时，1 μg/mL

对于不同实验的比较，刺激时间应始终相同。

4. 使用细胞刮刀小心收集细胞，或者在处理较小体积时通过上下吹打来收集细胞。用预冷缓冲液冲洗培养皿。用显微镜检查是否有任何剩余细胞，如有必要，再次冲洗培养皿。

【2.3 细胞因子分泌分析】

▲ 该检测试剂盒针对 IFN-γ 分泌细胞总数 <5% 的细胞样品进行了优化。如果预计 IFN-γ 分泌细胞 ≥5%，则在细胞因子分泌期间需要进一步稀释细胞，因此需要更大的试管。稀释可防止在此期间不分泌 IFN-γ 的细胞发生非特异性染色。

▲ 对于每 10^7 个细胞的检测，准备：

100 mL 预冷缓冲液 (2-8 °C)

100 μ L 预冷培养基 (2–8 °C)

10 mL 或 100 mL 温热培养基 (37°C)。

▲ 工作速度快，保持细胞低温，并使用预冷溶液。这将防止细胞表面上的抗体加帽和非特异性细胞标记。

▲ 本试剂盒每次能检测 10^7 个细胞。当使用少于 10^7 个细胞时，请使用所示的相同体积。当处理更多的细胞数时，相应地扩大所有试剂体积（例如，检测 2×10^7 总细胞，使用所有指定试剂体积的两倍）。

▲ 不要通过倾倒除去上清液。这将导致细胞损失和不准确的孵育体积。完全吸出上清液。

▲ 死细胞可能会非特异性地结合磁珠或抗体。因此，处理含有大量死细胞的细胞制剂时，应在开始前将其除去，例如通过密度梯度离心或使用死细胞去除试剂盒。

【IFN- γ Catch Reagent 标记细胞】

1. 样品放在 15 mL 可封闭试管中，总共 10^7 个细胞。

2. 加入 10 mL 预冷缓冲液洗涤细胞，2–8 °C 条件下， $300 \times g$ 离心 10 分钟，完全吸出上清。

▲ 注意：请勿通过倾倒的方式去除上层液体。这将导致细胞损失和不正确的孵育体积。

3. 每 10^7 个总细胞用 80 μ L 预冷培养基重悬。

4. 每 10^7 个总细胞添加 20 μ L IFN- γ Catch Reagent，充分混合，并在冰上孵育 5 分钟。

【IFN- γ 分泌期】

1. 加入适量 (37°C) 培养基来稀释细胞。

IFN- γ 分泌细胞的预期数量	稀释度	每 10^7 细胞添加培养基量
<5%	10^6 cells/mL	10 mL
$\geq 5\%$	$\leq 10^5$ cells/mL	100 mL

▲ 对于细胞因子分泌细胞的频率>20%，细胞需要进一步稀释。

2. 细胞置于密闭试管中，在 37 °C 缓慢连续旋转孵育 45 分钟，每 5 分钟转动一次试管以重悬沉降的细胞。

▲ 在此步骤中，防止细胞接触至关重要，以避免细胞因子交叉污染。

【用 IFN- γ 检测抗体标记细胞】

1.把管子放在冰块上。

2. 用预冷缓冲液洗涤细胞，并在 2–8°C 下以 300×g 离心 10 分钟。完全吸出上清液。

▲ 注意：如果细胞悬液的体积大于添加缓冲液的体积，请重复洗涤步骤。

3.每 10⁷ 个细胞，加入 80 μ L 预冷缓冲液。

4.每 10⁷ 个细胞加 20 μ L 干扰素- γ 检测抗体(PE)。

5.(可选)添加额外的染色试剂，例如 CD4-FITC 10 μ L 或 CD8-FITC 和 CD14-PerCP 10 μ L。

6.混合均匀，在冰上孵育 10 分钟。

7.加入 10ml 预冷缓冲液洗涤细胞，在 2–8°C 下，300×g 离心 10 分钟，吸出上清。

8.进行磁性标记。

【2.4 磁性标记】

▲ 建议的孵育温度为 2–8 °C。较高的温度和/或较长的孵育时间可能会导致非特异性细胞标记。

在冰上工作可能需要增加孵育时间。

▲ 为了获得最佳性能，在磁分选之前获得单细胞悬液非常重要。将细胞通过 30 μ m 尼龙网（预分离过滤器，30 μ m）以去除可能堵塞分选柱的细胞团块。

1.每 10⁷ 个细胞，加入 80 μ L 预冷缓冲液。

2.每 10⁷ 个细胞加 20 μ L 超纯抗 PE 磁珠。

3. 混合均匀，在 2–8°C 下孵育 15 分钟。。

4. 加入 10ml 预冷缓冲液洗涤细胞，2–8°C ， 300×g 离心 10 分钟，吸出上清液。

5.用 500 μ l 预冷缓冲液重悬细胞。

6.（可选）在浓缩前取一份进行流式细胞仪分析和细胞计数。

7.进行磁分选。

【2.5 磁性分选】

▲ 根据总细胞数和标记细胞数选择合适的分选柱和分选器。

▲ 富集抗原特异性 T 细胞时，请务必连续过两次分选柱以获得最佳结果。

1. 将分选柱放置在分选器的磁场中。

2. 将分选柱中加入适量缓冲液，充分湿润分选柱:

xM: 500 μ L xL: 3 mL

3. 将细胞悬液加到分选柱中。

4. 结合磁珠的细胞会被吸附到分选柱上，没有结合的细胞会顺着液体流下来。加适量的缓冲液，待液体全部流尽，再加入适量缓冲液，一共洗 3 次。收集总流出物。这是未标记的细胞。

xM: 3 \times 500 μ L xL: 3 \times 3 mL

5. 将分选柱从分选器中取出，并将其放在合适的收集管上。

▲ 要重复两次柱分选，您可以将细胞直接从第一次洗脱到第二个分选柱上。

6. 加适量的缓冲液到分选柱中，迅速用塞子推下，立即将磁性标记的细胞冲洗出来。

xM: 1 mL xL: 5 mL

7. 为了提高 IFN- γ 分泌细胞的纯度，可以在第二个分选柱上富集洗脱组分。使用新分选柱重复步骤

1 至 6 中所述的磁分选程序。

8. 继续进行分析、细胞培养或其他后续实验。

[3. 分泌 IFN- γ 的 T 细胞的检测和分析]

▲ 在采集前添加碘化丙啶 (PI) 或 7-AAD 至终浓度 0.5 μ g/mL, 以从流式细胞术分析中排除死细胞。与 PI 一起孵育较长时间会影响细胞的活力，使用 PI 或 7-AAD 时请勿固定细胞。

▲ 为了获得最佳灵敏度，必须从抗原刺激的样品以及对照样品中获取适当数量的活细胞。

我们描述了使用干扰素- γ 分泌检测试剂盒检测干扰素- γ 分泌的 T 细胞。以下详细的描述包括如何设

置门，可以作为分析样品的参考。

1. CMV+供体的 10^7 个人 PBMC 在有或没有 CMV 裂解物 ($5 \mu\text{g}/\text{mL}$) 的情况下孵育 16 小时。
2. 对刺激和未刺激的样品进行 IFN- γ 分泌测定。
3. 使用 CD4-FITC 对 T 细胞进行复染。
4. 用 CD14-PerCP 对单核细胞进行染色。
5. 用 PI 对死细胞进行染色，PI 在流式细胞分析之前添加至终浓度 $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。
6. 通过流式细胞术从刺激样品和未刺激样品中获取 200,000 个浓缩前组分和完全浓缩组分的活细胞。
7. 在进一步设门以排除单核细胞和碎片之前，激活基于前向散射 (FSC) 和侧向散射 (SSC) 特性的淋巴细胞门控。
8. 根据通道 PE 与通道 PerCP 中的 PI 和 CD14-PerCP 染色排除死细胞和单核细胞。

▲ 死细胞排除对于稀有抗原特异性 T 细胞的分析至关重要，因为死细胞可能与抗体或磁珠非特异性结合。

▲ 通过排除不需要的非 T 细胞（如可能导致非特异性背景染色的单核细胞），可以进一步提高检测灵敏度。