

IL-17 分泌富集和检测试剂盒 (PE), 小鼠(92-01-0314)

[组分] 1 mL mouseIL-17Catch Reagent: 抗 IL-17 单克隆抗体 (大鼠 IgG1) 与细胞表面特异性单克隆抗体 (大鼠 IgG2b) 偶联。

1 mL IL-17 检测抗体 (生物素): 与 PE 偶联的抗 IL-17 单克隆抗体 (大鼠 IgG1)。

0.2 mL 抗生物素-PE: 与 PE 偶联的单克隆抗体 (小鼠 IgG1)。

1 mL 抗 PE 磁珠: 与单克隆小鼠抗 PE 抗体 (小鼠 IgG1) 偶联的磁珠。

[规格] 50 次检测, 总计 10^7 细胞数。

[保存形式] 所有组分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 IL-17 分泌检测试剂盒鼠抗原特异性 T 细胞。用特异性肽、蛋白质或其他抗原制剂在短时间内重新刺激小鼠脾细胞或其他含有单细胞制剂的白细胞。

随后, 将 IL-17 特异性 Catch Reagent 附着到所有白细胞的细胞表面。然后将细胞在 37°C 下短时间培养让细胞因子分泌。分泌的 IL-17 与阳性分泌细胞上的 IL-17 Catch Reagent 结合。随后用 IL-17 特异性抗体 (即与藻红蛋白 (PE) 偶联的 IL-17 检测抗体) 标记这些细胞, 以便通过流式细胞术进行灵敏度检测。

IL-17 分泌细胞可以用抗 PE 磁珠进行磁性标记, 并通过置于分选器磁场中的分选柱进行富集。磁性标记的细胞保留在分选柱中, 而未标记的细胞则通过。将柱从磁场中移开后, 磁性保留的细胞可以作为阳性选择的细胞洗脱, 富集细胞因子分泌细胞。这些细胞现在可用于细胞培养或分析。可以通过排除死细胞来最大程度地减少非特异性背景, 以提高的分析灵敏度。

[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) FcR 封闭试剂，小鼠。
- (可选)用于流式细胞术分析的荧光标记抗体如 CD4-APC、Anti-IL-17 A-PE 和 CD45R (B220)-VioBlue。
- (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)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 IL-17 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。当使用免疫小鼠时，可能需要进行分析未免疫小鼠细胞的实验。

阳性对照：当建立新的实验时，建议设定阳性对照。

【1.2 再刺激动力学和推荐时间】

用 PMA/离子霉素刺激后，1-4 小时后可分析细胞的 IL-17 分泌情况。

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 IL-17 检测抗体对 IL-17 分泌细胞进行染色。建议用 CD4-FITC 或 CD8a-PE 对 T 细胞进行复染。

▲ 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 VioBlue 偶联的抗体（例如 CD45R (B220)-VioBlue）标记不需要的非 T 细胞（例如 B 细胞）。然后通过设门将这些细胞与 PI 染色的死细胞一起排除。

【1.4 双色细胞因子分析】

通过将 IL-17 分泌检测试剂盒与 IFN- γ 分泌检测试剂盒 (APC)，通过两种颜色细胞因子分析，可以同时分析分泌 IL-17 的细胞产生的 IFN- γ 情况。

【1.5 与肽-MHC 四聚体染色组合】

通过将 IL-17 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 IL-17 分泌细胞的肽-MHC 四聚体。

【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 IL-17 分泌细胞，您也许无需事先富集即可分析 IL-17 分泌细胞。

[2. IL-4 分泌测定实验方案]

【2.1 细胞制备】

小鼠脾脏制备：在无菌条件下制备新鲜小鼠脾细胞或其他含有白细胞的单细胞制剂。操作过程需要避免产生过多的死亡细胞。

【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鼠蛋白质（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， $200\times g$ 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：加入离子霉素 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 和 PMA (10 ng/mL) ，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 3 小时。

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 IL-17 分泌细胞总数 <2% 的细胞样品进行了优化。如果预计 IL-17 分泌细胞 $\geq 2\%$ ，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 IL-17 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 $^{\circ}\text{C}$)

100 μL 或 500 μL 预冷培养基 (2–8 $^{\circ}\text{C}$)

10 mL 或 100 mL 温热培养基 (37 $^{\circ}\text{C}$) 。

▲ 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。

【IL-17 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 $^{\circ}\text{C}$ 条件下，300 $\times g$ 离心 10 分钟，完全吸出上清。重复洗涤步骤，完全吸去上清液。

▲ 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 个总细胞用预冷培养基重悬，培养基体积见下表。

4. 每 10^7 个总细胞添加适量 IL-17Catch Reagent, 充分混合, 并在冰上孵育 5 分钟。

IL-17 分泌细胞的预期数量	预冷培养基	IL-17Catch Reagent
<2%	80 μ L	20 μ L
\geq 2-20%	450 μ L	50 μ L

【IL-17 分泌期】

1. 加入适量 (37°C) 培养基来稀释细胞。

IL-17 分泌细胞的预期数量	稀释度	每 10^7 细胞添加培养基量
<2%	10^6 cells/mL	10 mL
2-20%	$\leq 10^5$ 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。

【IL-17 检测抗体 (生物素) 和抗生物素-PE 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 $300 \times g$ 离心 10 分钟。完全吸出上清液。重复洗涤步骤, 完全吸出上清液。

3. 每 10^7 个细胞, 加入适量预冷缓冲液。

4. 每 10^7 个细胞加适量 IL-17 检测抗体(生物素)。

IL-17 分泌细胞的预期数量	预冷缓冲液	小鼠 IL-17 检测抗体 (生物素)
<2%	80 μ L	20 μ L
\geq 2-20%	450 μ L	50 μ L

▲ 为避免非特异性结合, 建议使用 FcR 封闭试剂。

5.混合均匀，在冰上孵育 10 分钟。

6.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。

7.每 10⁷ 个细胞，加入适量预冷缓冲液重悬，并根据下表每 10⁷ 个总细胞添加适量抗生物素-PE。

IL-17 分泌细胞的预期数量	预冷缓冲液	抗生物素-PE
<2%	96μL	4 μL
≥2-20%	490 μL	10 μL

8. 混合均匀，在冰上孵育 10 分钟。

9. 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。

10.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 μm 尼龙网（预分离过滤器，30 μm）以去除可能堵塞分选柱的细胞团块。

1.每 10⁷ 个细胞，加入适量预冷缓冲液（见下表）。

2.每 10⁷ 个细胞加适量抗 PE 磁珠（见下表）。

IL-17 分泌细胞的预期数量	预冷缓冲液	抗生物素-PE
<2%	80μL	20μL
≥2-20%	450 μL	50 μL

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 500μl 预冷缓冲液重悬细胞。

6.（可选）在富集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 IL-4 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 IL-17 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 IL-4 分泌检测试剂盒检测分泌 IL-4 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. 用或者不用离子霉素 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 和 PMA (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 刺激小鼠脾细胞 3 小时。
2. 对刺激和未刺激的样品进行小鼠 IL-17 分泌测定。
3. 使用 CD4-APC 对 T 细胞进行复染。
4. B 淋巴细胞用 CD45R (B220)-VioBlue 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 CD45R (B220)-VioBlue 染色排除死细胞和 B 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，可以进一步提高检测灵敏度。