

T细胞活化/扩增试剂盒，小鼠(92-01-0102)

[组分]

2 mL 细胞培养级抗生物素磁珠，相当于 4×10^8 磁珠颗粒；与单克隆抗生物素抗体偶联的磁珠颗粒。

0.4 mL 小鼠 CD3 ϵ -生物素 (100 μ g/mL)

0.4 mL 小鼠 CD28 -生物素 (100 μ g/mL)

[保存形式] 所有成分均在含有稳定剂的无叠氮缓冲液中供应。低内毒素。

[储存条件] 2 - 8 °C 避光保存，请勿冻存。有效期见试剂外标签。

[分选原理]

T 细胞活化/扩增试剂盒用于激活和扩增小鼠 T 细胞。该试剂盒由抗生物素磁珠颗粒和针对小鼠 CD3 ϵ 和 CD28 的生物素化抗体组成。装有生物素化抗体的抗生物素磁珠颗粒可用于模拟抗原递呈细胞，激活脾脏或淋巴结单细胞悬液中的静息 T 细胞以及纯化的 T 细胞。T 细胞扩增通过培养实现，并在培养的第 6-8 天重新激活。

[背景信息]

抗生物素磁珠颗粒的第一步是加入生物素化抗体。使用等量的抗 CD3 ϵ 和 CD28 的生物素化抗体可达到最佳激活和扩增效果。

▲ 注：如有需要，可对生物素化抗体的其他组合进行试验，以确定其适用性。

装载的抗生物素磁珠颗粒随后可用于激活和扩增 T 细胞。每个细胞使用 1-2 个负载的抗生物素磁珠颗粒（颗粒与细胞的比例为 1:1 或 2:1），并辅以重组白细胞介素 2 (IL-2)，可实现对 T 细胞的最佳刺激。

▲ T 细胞活化的效率取决于 T 细胞的分化状态，而分化状态往往是不均匀的。因此，对于特殊应用，建议通过实验确定最佳的珠子与细胞比率以及细胞培养基中的 IL-2 浓度。

▲ 过度激活 T 细胞有可能导致激活诱导的细胞死亡。

使用抗生物素磁珠颗粒激活的 T 细胞可用于任何下游处理，如细胞因子分析或免疫沉淀。此外，活化的 T 细胞还可以进行高效转染。

抗生物素磁珠颗粒不会显示自发荧光，在流式细胞分析前通常无需去除。不过，如果需要，使用分离器可轻松去除抗生物素磁珠颗粒。

[试剂和仪器要求]

● 缓冲液：配制含有 pH 7.2 PBS、2 mM EDTA 的溶液。将缓冲液置于 2-8 °C。

▲ 注：EDTA 可由其他补充剂替代，如抗凝柠檬酸葡萄糖配方-A (ACD-A) 或柠檬酸磷酸葡萄糖 (CPD)。

不建议使用含有 Ca^{2+} 或 Mg^{2+} 的缓冲液或培养基。

● 培养基

● 加湿培养箱

● 样品混悬仪，用于装载磁珠颗粒。

● （可选）磁珠分离器，用于在下游实验之前去除 T 细胞扩增后的抗生物素磁珠颗粒。

▲ 注意：请勿使用 MACS 分选柱和分离器去除该磁珠颗粒。

- （可选）用于流式细胞分析的荧光抗体，如 CD4-FITC、CD8a-PE 或 CD25-Vio® Bright FITC。
- （可选）碘化丙啶溶液或 7-AAD 染色溶液，用于流式细胞仪排除死细胞。
- （可选）重组白细胞介素-2（IL-2），如小鼠 IL-2，研究级。

[步骤]

▲ 方案中的所有步骤都必须无菌条件下进行。

一、样本准备

用标准制备方法制备淋巴器官单细胞悬液。

二、抗生物素磁珠颗粒的加载

▲ 使用前将抗生物素磁珠颗粒充分涡旋重悬，以获得均匀的悬浮液。

▲ 抗生物素磁珠颗粒不含防腐剂。在无菌条件下取出等分样品。

▲ 建议以 1×10^8 抗生物素颗粒为一批加载抗生物素磁珠颗粒。加载的抗生物素磁珠颗粒在 $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下可保存 4 个月。

1. 将 $100\text{ }\mu\text{L}$ CD3 ϵ 生物素和 $100\text{ }\mu\text{L}$ CD28 生物素移入可密封的 2 mL 离心管中，混匀。

▲ 注：此抗体组合的最终抗体浓度为每 1 mL 加载的抗生物素磁珠颗粒含 $10\text{ }\mu\text{g}$ 抗体，可最大程度地激活 T 细胞。

2. 加入 $300\text{ }\mu\text{L}$ 缓冲液并混匀。

3. 涡旋充分重悬抗生物素磁珠颗粒。

4. 取出 $500\text{ }\mu\text{L}$ 抗生物素磁珠颗粒（ 1×10^8 抗生物素磁珠颗粒），加入到抗体混合物中。

▲ 注意：抗生物素磁珠颗粒可以灵活地加入生物素化的抗体或配体。如果需要，可添加适当浓度的其他生物素化抗体或配体，并用缓冲液相应调整至 1 mL 总体积。

5. 使用样品混悬仪，以大约每分钟 4 转的速度（最慢的永久运行程序），在 2-8 °C 温度下恒定、轻柔地旋转孵育 2 小时。

6. 加载的抗生物素磁珠颗粒（ 1×10^8 抗生物素磁珠颗粒/毫升）现在可以使用。不要从抗体混合物中移除已装载的抗生物素磁珠颗粒。在 2-8 °C 下可保存 4 个月。

三、T 细胞活化和扩增方案

▲ 下面给出的活化和扩增体积是 2×10^6 淋巴细胞或分离细胞和 2×10^6 或 4×10^6 抗生物素磁珠颗粒（颗粒与细胞比为 1:1 或 2:1）的体积，具体取决于实验确定的相应细胞和小鼠模型的最佳颗粒与细胞比。当处理细胞数较多时，应相应放大所有试剂体积和总体积（例如，细胞总数为 4×10^6 时，所有标示试剂体积和总体积的两倍）。

1. 彻底重悬已加载的抗生物素磁珠颗粒，每 2×10^6 细胞需要 20 μ L 或 40 μ L（ 2×10^6 或 4×10^6 已加载的抗生物素磁珠颗粒）已加载的抗生物素磁珠颗粒，转移到合适的离心管中。

▲ 注：如果阴性对照实验使用未加载的磁珠颗粒，则每 2×10^6 细胞加入 20 μ L 或 40 μ L（ 2×10^6 或 4×10^6 磁珠）未装载的抗生物素磁珠颗粒，以取代已装载的抗生物素磁珠颗粒。

2. 向已加载的抗生物素磁珠颗粒中加入 1 mL 培养液，300 $\times$ g 离心 5 分钟。

3. 吸取上清液，将加载的抗生物素磁珠颗粒重悬于 1 mL 新鲜培养基（如 RPMI 1640 或 TexMACS 培养基）中，培养基中添加 10% FBS 和 30-100 单位 IL-2/mL。



▲ 注：与 CD8+ T 细胞相比，添加低量 IL-2 可使 CD4+ T 细胞扩增率更高，而添加高量 IL-2 可使 CD8+ T 细胞扩增率更高。

4. 以每毫升培养基 2×10^6 个细胞的密度将细胞重悬于添加 10% FBS 和 IL-2 的 RPMI 1640 或 TexMACS 培养基中。

▲ 注：特定培养基（如 TexMACS 培养基）可能有利于 T 细胞扩增。

5. 将细胞悬液和步骤 3 中制备的抗生物素磁珠颗粒以每毫升每平方厘米 1×10^6 细胞的密度加入到合适的细胞培养容器中（例如，24 孔板中 2×10^6 细胞 2 mL/孔）。

6. 在 37 °C 和 5-10% CO₂ 下培养 2 天。

▲ 注：每天检查培养物，必要时添加新鲜培养基。

7. 第 2 天，轻轻上下移动培养物，使所有细胞团块破裂。

8. 根据细胞增殖情况，每两天将细胞培养物以 1:4 或 1:2 的比例分割，并加入补充有 10% FBS 和 IL-2 （每毫升每平方厘米 1×10^6 细胞）的新鲜培养基。

▲ 注意：每天检查培养物。根据扩增速度，可能需要比每 2 天更频繁地分割培养物。

9. 激活 6-8 天后，T 细胞处于静息状态，T 细胞的进一步扩增需要重新刺激。

四、免疫荧光染色

▲ 下面给出的荧光标记体积是 10^6 细胞总数的体积。在处理少于 10^6 和最多 10^7 的细胞时，请使用所示的相同体积。

▲ 磁珠颗粒不显示自发荧光，流式细胞分析前无需去除。

▲ 经过长达 24 小时的刺激后，由于细胞与磁珠颗粒之间的强烈相互作用，细胞的散射特性可能会发生改变。

▲ 受刺激时，CD3 的表达可能会短暂下调。因此，CD3 在活化细胞表面的染色可能会受到影响。

1. 重悬细胞，打散细胞团块。

▲ 注意：在对细胞进行短期刺激期间（最多 24 小时），抗生物素磁珠颗粒可能会与细胞紧密结合。分析前应注意彻底重悬细胞。

2. 每 10^6 个细胞加入 1-2 mL 缓冲液清洗细胞，然后 $300\times g$ 离心 10 分钟。完全吸出上清液。

3. 在用缓冲液重悬的 10^6 细胞中每种染色抗体加入 10 μL ，如 CD4-FITC，使总体积达到 110 μL 。

4. 混匀并在冰箱（2-8 $^{\circ}\text{C}$ ）中暗处孵育 10 分钟。

▲ 注意：温度过高和/或孵育时间过长会导致非特异性细胞标记。在冰上操作需要延长孵育时间。

5. 每 10^6 个细胞加入 1-2 mL 缓冲液清洗细胞，然后 $300\times g$ 离心 10 分钟。完全吸出上清液。

6. 用适量的缓冲液重悬细胞团，以使用流式细胞仪或荧光显微镜进行分析。

五、抗生物素磁珠颗粒的去除

▲ 在用不同制剂或抗原重新刺激之前，可能需要去除磁珠颗粒。

1. 收集细胞并转移到 5 mL、15 mL 或 50 mL 离心管中，用缓冲液清洗一次。

2. 以每 1 mL 细胞 2×10^7 的密度将细胞重悬于缓冲液中，并充分涡旋。

3. 将离心管放入分离器的磁场中。

▲ 注：使用试管架将 5 mL 离心管插入分离器的磁场中。

4. 让磁珠颗粒附着在离心管壁上：



5 mL 离心管：2 分钟

15 mL 或 50 mL 离心管：4 分钟

5. 将离心管保持在磁铁中，小心地移除上清液，并将其放入新的离心管中。

6. 将离心管从分离器中取出，加入缓冲液至与之前相同的体积。

7. 涡旋样品，将离心管放入分离器中，重复步骤 4-5。

8. 现在可根据需要进一步处理收集的细胞。