

## IFN- $\gamma$ 分泌富集和检测试剂盒 (PE), 小鼠(92-01-0312)

**[组分]** 1 ml 小鼠 IFN- $\gamma$  Catch Reagent: 抗 IFN- $\gamma$  单克隆抗体 (rat Ig G 1) 与细胞表面特异性单克隆抗体 (rat IgG2b) 偶联。

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

1mL 抗 PE 磁珠: 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]

为了使用小鼠 IFN- $\gamma$  分泌测定法分析鼠抗原特异性 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, 将干扰素- $\gamma$  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- $\gamma$  结合于阳性分泌细胞上的干扰素- $\gamma$  捕捉剂。随后用第二种干扰素- $\gamma$  特异性抗体: 干扰素- $\gamma$  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- $\gamma$  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 CD4-FITC 或 CD8-FITC 和 CD45R/B220-PerCP。
- (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(30μm)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- $\gamma$  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 10μg/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- $\gamma$  分泌细胞不能对干扰素- $\gamma$  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- $\gamma$  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- $\gamma$  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- $\gamma$  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- $\gamma$  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- $\gamma$  检测抗体对干扰素- $\gamma$  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 B 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 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- $\gamma$  分泌细胞，您也许无需事先富集即可分析 IFN- $\gamma$  分泌细胞，该测定也可以直接从全血开始进行。

## 【2. IFN- $\gamma$ 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。  
避免产生过多的死亡细胞。

### 【2.2 体外刺激】

▲ 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 FCS）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、 $5\times 10^6$  个细胞/cm<sup>2</sup>。
3. 添加抗原或对照品：

肽：37 °C、5–7% CO<sub>2</sub> 下 3–6 小时，1–10 µg/mL

蛋白质：37 °C、5–7% CO<sub>2</sub> 下 6–16 小时，10 µg/mL

SEB：37 °C、5–7% CO<sub>2</sub> 下 3–16 小时，10 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- $\gamma$  分泌细胞总数 <2% 的细胞样品进行了优化。如果预计 IFN- $\gamma$  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 IFN- $\gamma$  的细胞发生非特异性染色。

▲ 对于每 10<sup>7</sup> 个细胞的检测，准备：

100 mL 预冷缓冲液 (2–8 °C)

100 µL 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<sup>7</sup> 个细胞。当使用少于 10<sup>7</sup> 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<sup>7</sup> 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- $\gamma$ Catch Reagent 标记细胞】

1. 样品放在 15 mL 可封闭试管中，总共 10<sup>7</sup> 个细胞。

2. 加入 10 mL 预冷缓冲液洗涤细胞，2–8 °C 条件下，300 × 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  $10^7$  个总细胞用适量预冷培养基重悬。

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

IFN- $\gamma$ 分泌细胞的预期数量	预冷培养基	Catch Reagent
<2%	80 $\mu$ l	20 $\mu$ l
2-20%	450 $\mu$ l	50 $\mu$ l

### 【IFN- $\gamma$ 分泌期】

1. 加入适量（37°C）培养基来稀释细胞。

IFN- $\gamma$ 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。

### 【用 IFN- $\gamma$ 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  $300\times g$  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  $10^7$  个细胞，加入适量预冷缓冲液。

4. 每  $10^7$  个细胞加适量干扰素- $\gamma$  检测抗体(PE)。

IFN- $\gamma$ 分泌细胞的预期数量	预冷缓冲液	干扰素- $\gamma$ 检测抗体(PE)
<2%	80 $\mu$ l	20 $\mu$ l
2-20%	450 $\mu$ l	50 $\mu$ l

- 5.(可选)添加额外的染色试剂，例如 CD4-FITC 10 $\mu$ L 或 CD8-FITC 和 CD45R/B220-PerCPTM 10 $\mu$ 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 $\times$ 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  $\mu$ m 尼龙网（预分离过滤器，30  $\mu$ m）以去除可能堵塞分选柱的细胞团块。

- 1.每 10<sup>7</sup> 个细胞，加入适量预冷缓冲液。
- 2.每 10<sup>7</sup> 个细胞加适量抗 PE 磁珠。

IFN- $\gamma$ 分泌细胞的预期数量	预冷缓冲液	抗 PE 磁珠
<2%	80 $\mu$ l	20 $\mu$ l
2-20%	450 $\mu$ l	50 $\mu$ l

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 $\times$ g 离心 10 分钟，吸出上清液。
- 5.用 500 $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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- $\gamma$  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- $\gamma$ 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  $\mu$ 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- $\gamma$  分泌检测试剂盒检测干扰素- $\gamma$  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. BALB/c 小鼠腹膜内 (i.p.) 免疫接种 100  $\mu$ g HEL 完全弗氏佐剂和 200 ng 百日咳毒素。24 小时后

再次腹膜内注射百日咳毒素 200 ng。

2. 3 周后，取免疫小鼠和未免疫对照小鼠的  $10^7$  个小鼠脾细胞在有或没有 100 $\mu$ g/ml HEL 的情况下体外培养 16 小时。

3. 对 HEL 免疫小鼠的刺激和未刺激样品以及未免疫小鼠的刺激样品进行小鼠 IFN- $\gamma$  分泌测定。

4. 使用 CD4-FITC 对 T 细胞进行复染。

5. 用 CD45R/B220-PerCPTM 对 B 淋巴细胞进行染色。

6. 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 $\mu$ g/mL。

7. 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。

8. 在进一步设门以排除 B 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 PI 和 CD45R/B220-PerCPTM 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（如可能导致非特异性背景染色的 B 细胞），可以进一步提高检测灵敏度。