

调节性B细胞分选试剂盒，小鼠(92-01-0333)

[组分]

2 mL 调节性 B 细胞生物素抗体混合物，小鼠：抗 CD4、CD11c、CD49b、CD90.2、Gr-1 和 Ter119 的单克隆抗小鼠抗体偶联生物素混合物。

2×2 mL 抗生物素磁珠：与单克隆生物素抗体（同种型：小鼠 IgG1）偶联的磁珠。

1mL 调节性 B 细胞捕获试剂，小鼠：抗 IL-10 单克隆抗体（大鼠 IgG2b）与 CD45 特异性单克隆抗体（大鼠 IgG2b）偶联。

1 mL 调节性 B 细胞检测抗体（PE）：与 PE 偶联的 IL-10 单克隆抗体（大鼠 IgG1）。

2mL 抗 PE 磁珠：与单克隆抗 PE 抗体（同种型：小鼠 IgG1）偶联的磁珠。

[规格] 可分选 2×10^9 个细胞总量，多达 20 次分选。

[保存形式] 所有组分均储存在含有稳定剂和 0.05% 叠氮化钠的缓冲液中。

[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]

调节 B 细胞的分选分三步进行。首先，通过去除非 B 细胞预富集 B 细胞。其次，用 LPS，PMA 和离子霉素等在培养物中刺激预富集的 B 细胞 5 小时，以诱导 IL-10 分泌。第三，通过使用细胞因子分泌测定技术特异性分离产生 IL-10 的活细胞。

因此，IL-10 特异性捕获试剂附着在细胞表面。这些细胞在 37°C 下短时间内孵育，以允许细胞因子的分泌。分泌的 IL-10 与细胞因子分泌细胞上的调节性 B 细胞捕获试剂结合。随后，用第二种 IL-

10 特异性抗体标记这些细胞，该抗体是与 PE 偶联的调节性 B 细胞检测抗体，用于通过流式细胞术进行高灵敏检测。然后可以用抗 PE 磁珠磁性标记分泌 IL-10 的细胞，并在放置在分选器磁场中的分选柱上进行浓缩。磁性标记的部分被保留在柱内。未标记的细胞贯穿其中。经分离后，磁性标记的分泌 IL-10 的细胞可被洗脱为阳性选择的细胞部分。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结合。这提供了最高的分析灵敏度。

[背景信息]

免疫耐受体现了免疫系统下调免疫反应的能力。通常认为 B 细胞通过产生特异性抗体并帮助诱导最佳的 CD4⁺T 细胞激活来发挥积极调节的免疫反应。然而，B 细胞和特定 B 细胞亚群也可以负向调节小鼠的免疫反应，从而验证了调节性 B 细胞的存在。调节功能是通过细胞因子 IL-10 的产生直接完成的。自身免疫和炎症部分由这些调节性 B 细胞控制。调节性 B 细胞分选试剂盒的设计用于分选、检测和分析分泌 IL-10 的活鼠 B 细胞。

[试剂和仪器要求]

- 缓冲液：配制含有 pH 7.2 PBS、0.5% 牛血清白蛋白（BSA）和 2 mM EDTA 的溶液。使用前对缓冲液进行脱气处理，因为空气气泡可能会堵塞分选柱。
- ▲ 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）。BSA 可以用其他蛋白质代替，例如小鼠血清白蛋白、小鼠血清或胎牛血清。不建议使用含有 Ca²⁺ 或 Mg²⁺ 的缓冲液或培养基。

- 培养基，例如含有稳定谷氨酰胺的 RPMI 1640 (# 130-091-439)，含有 10% FBS、200 $\mu\text{g/mL}$ 青霉素、200 U/mL 链霉素和 $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ 2-ME。
- 细胞刺激试剂，例如 LPS、PMA 和离子霉素，或纯 CD40 -功能级，小鼠。
- (可选) 荧光偶联的抗体用于流式分析。
- (可选) PI 或 7-AAD 可以用于流式分析中排除死细胞。
- (可选) FcR 封闭试剂，小鼠。以避免 Fc 受体介导的抗体标记。
- 选择合适的分选柱和分选器
- 冷冻离心机 (2-8°C) 。
- 试管旋转器。
- (可选) 预分离过滤器去除细胞团块。

[步骤]

一、磁珠标记

在无菌条件下从小鼠脾脏制备单细胞悬液。

▲死细胞可能与磁珠非特异性结合。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。

▲ 快速工作，保持细胞低温，并使用预冷溶液 (2-8°C) ，将防止细胞表面的非特异性标记。

▲ 下面给出的磁珠标记规模为 10^8 个细胞总量。当处理更多或者更少 (至少 10^8 总细胞) 的细胞时，相应地扩大或缩小所有试剂体积和总体积(例如，对于 2×10^8 总细胞，使用所有指示试剂体积和总体积的两倍体积)。

▲ 为了获得最佳性能，在磁标记之前获得单细胞悬浮液是很重要的。将细胞通过 30 μ m 尼龙网，去除可能堵塞分选柱的细胞团块。使用前用缓冲液湿润过滤器。

▲ 在冰上工作可能需要增加孵育时间。较高的温度和/或较长的孵育时间可能导致非特异性细胞标记。

1. 细胞计数。
2. 300×g 离心 10 分钟。去除上清液。
3. 每 10^8 个细胞总量使用 400 μ L 缓冲液重悬。
4. 每 10^8 个细胞总量添加 100 μ L 调节性 B 细胞生物素抗体混合物。
5. 充分混匀，2-8 °C 孵育 10 分钟。
6. 每 10^8 个细胞总量添加 300 μ L 缓冲液和 200 μ L 抗生物素磁珠。
7. 充分混匀，2-8 °C 孵育 15 分钟。
8. 进行细胞分选。

二、细胞分选

▲ 在无菌条件下进行操作。

使用分选 LD 柱进行分选

1. 将 LD 分选柱置于合适的分选器中。
2. 用 2mL 缓冲液润洗分选柱。
3. 将细胞悬液转移至分选柱中。
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 1mL 缓冲液，待液体全部流尽，再加入 1mL 缓冲液。收集总流出物，这是未标记的预富集 B 细胞部分。

5. (可选)从分选器中取出分选柱并将其放置在合适的收集管上。将 3mL 缓冲液移至柱上。将柱塞用力推入柱中，立即冲洗掉磁性标记的非 B 细胞。
6. 继续刺激 B 细胞。

三、体外刺激 B 细胞

实验中始终包含阴性对照。

1. 确定细胞数。
2. 加入培养基洗涤细胞， $300\times g$ 离心 10 分钟。完全吸出上清液。
3. 将细胞以 2.5×10^6 个细胞/mL 和 1.25×10^6 个细胞/cm² 重悬于培养基中，例如 12 孔板的 2 mL 培养基/孔中含有 5×10^6 个 B 细胞。
4. 添加刺激试剂，例如 10 μ g/mL LPS 大肠杆菌血清型 0111: B4，在 37 °C、5% CO₂ 下培养 5-48 小时，最后 5 小时添加 50 ng/mL PMA 和 500 ng/mL 离子霉素。

为了比较不同实验，刺激时间应始终相同。

5. 通过上下吹打小心收集细胞。用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。

四、IL-10 分泌测定

▲ 对于每次测试总共 10^7 个的细胞，准备：100 mL 冷缓冲液（2-8 °C）、100 μ L 冷培养基（2-8°C）、10 mL 温培养基（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和细胞的非特异性标记（例外：分泌期间的温培养基）。
- ▲ 下面给出的体积最多适用于 10^7 个细胞。当使用少于 10^7 个细胞时，请使用所示的相同试剂体积。当使用更高的细胞数量时，相应地扩大所有试剂体积和总体积（例如，对于 2×10^7 总细胞，使用所有指定试剂体积和总体积的两倍）。
- ▲ 不要通过倾倒去除上清液。这将导致细胞损失和不正确的孵育体积。吸出上清液。
- ▲ 死细胞可能会非特异性地与抗体结合。因此，当处理含有大量死细胞的细胞制剂时，应在开始 IL-10 分泌测定之前将其去除，例如通过密度梯度离心或使用死细胞去除试剂盒。

4.1 使用调节性 B 细胞捕获试剂标记细胞

1. 确定细胞数。
2. 每个样品在 15 mL 可封闭试管中总共使用 10^7 个细胞。
3. 加入 10 mL 冷缓冲液洗涤细胞，2–8 °C $300 \times g$ 离心 10 分钟，完全吸出上清液。重复洗涤步骤。
4. （可选）Fc 受体试剂阻断非特异性结合。
5. 将每 10^7 个细胞重悬于 90 μ L 冷培养基中。
6. 每 10^7 个总细胞添加 10 μ L 调节性 B 细胞捕获试剂，充分混合并在冰上孵育 5 分钟。

4.2 IL-10 分泌期

1. 每 10^7 个总细胞添加 10 mL 温培养基 (37 °C)。

2. 使用试管旋转器将细胞在密闭试管中于 37 °C 缓慢连续旋转下孵育 45 分钟，或每 5 分钟转动试管以重悬沉淀的细胞。

▲ 注意：此步骤中务必防止细胞接触，避免细胞因子交叉污染。

4.3 调节性 B 细胞检测抗体 (PE) 标记细胞

1. 在管中填充冷缓冲液。

2. 将管置于冰上 5 分钟。

▲ 注意：细胞必须冷却，以防止 IL-10 对细胞进行非特异性标记。

3. 在 2–8 °C 下以 300×g 离心细胞 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，则重复洗涤步骤。

4. 将每 10^7 个细胞重悬于 90 μ L 冷缓冲液中。

5. 每 10^7 个总细胞添加 10 μ L 调节性 B 细胞检测抗体 (PE)。

6. (可选) 添加染色抗体，例如 10 μ L CD19-APC。

▲ 注意：不要使用 PE 的偶联物。

7. 充分混合并在冰上孵育 10 分钟。

8. 添加 10 mL 冷缓冲液，并在 2–8 °C 下以 300×g 离心 10 分钟。完全吸出上清液。

9. 继续进行磁性标记。

五. 分泌 IL-10 的 B 细胞的磁性标记

▲ 快速工作，保持细胞低温，并使用预冷的溶液。这将防止抗体与细胞的非特异性结合。

▲ 下面给出的磁性标记体积最多适用于 10^7 个细胞。当使用少于 10^7 个细胞时，请使用所示的相同试剂体积。当使用更高的细胞数量时，相应地扩大所有试剂体积和总体积（例如，对于 2×10^7 总细胞，使用所有指定试剂体积和总体积的两倍）。

▲ 为了获得最佳性能，在磁标记之前获得单细胞悬浮液非常重要。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。使用前用缓冲液润湿过滤器。

▲ 建议的孵育温度为 2–8 $^{\circ}\text{C}$ 。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。

1. 每 10^7 个总细胞将细胞沉淀重悬于 80 μL 冷缓冲液中。
2. 每 10^7 个总细胞添加 20 μL 抗 PE 磁珠。
3. 充分混合并在冰箱 (2–8 $^{\circ}\text{C}$) 中孵育 15 分钟。
4. 每 10^7 个总细胞添加 10 mL 冷缓冲液来洗涤细胞，并在 2–8 $^{\circ}\text{C}$ 下以 $300 \times g$ 离心 10 分钟。完全吸出上清液。
5. 将细胞沉淀重悬于 500 μL 冷缓冲液中。对于高于 5×10^7 的细胞数量，请使用 10^8 个细胞/mL 的稀释液。
6. 进行细胞分选。

六、细胞分选：富集 IL-10 分泌 B 细胞

使用 xM 或 xL 柱进行磁力分选

▲ 根据细胞总数和标记细胞数选择合适的分选柱和分选器。

▲ 始终等到柱储液器排空后再进行下一步。

▲ 重复两次连续的分选柱分选以获得最佳结果。

1. 将分选柱置于合适的分选器的磁场中。

2. 用适当体积的缓冲液润洗分选柱：

xM: 500 μ L

xL: 3 mL

3. 将细胞悬液转移至分选柱中。

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: 3×500 μ L

xL: 3×3 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。

▲ 注意：要进行第二次分选柱分选，可以将细胞直接洗脱到第二个分选柱上，不需要使用收集管。

6. 加适量的缓冲液到分选柱中，迅速用塞子推下，立即冲洗磁性标记的细胞。

xM: 1 mL

xL: 5 mL

7. 为了提高 IL-10 分泌细胞的纯度，洗脱的部分可以在第二个 xM 或 xL 柱上富集。用新的分选柱重复步骤 1 至 6 中描述的磁分选过程。

▲ 注意：后续细胞培养时，也可以用培养基洗脱细胞。如果通过流式细胞仪分析部分细胞，则培养基不应含有酚红。