

## Pan T细胞活化/扩增试剂盒，非人灵长类动物(92-01-0090)

### [组分]

2 mL 细胞培养级抗生物素磁珠颗粒，相当于  $4 \times 10^8$  磁珠颗粒；磁珠颗粒与单克隆抗生物素抗体连接。

0.4 mL CD2-生物素，人 (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

0.4 mL CD3-生物素，非人灵长类 (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

0.4 mL CD28 生物素，人 (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )。

**[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]** 4 - 8 °C 避光保存，请勿冻存。有效期见试剂外标签。

本产品适用于恒河猴 (*Macaca mulatta*) T 细胞的活化和扩增。经测试，试剂盒中的 CD3 抗体也可与猕猴 (*M. fascicularis*) 和猪尾猴 (*M. nemestrina*) 发生交叉反应。试剂盒中提供的 CD2 和 CD28 抗体也经测试与金丝猴 (*M. fascicularis*) 发生交叉反应。尚未测试与其他非人灵长类动物的交叉反应。

### [原理]

T 细胞激活/扩增试剂盒用于激活猕猴 T 细胞，必要时还可扩增 T 细胞。该试剂盒由抗生物素磁珠颗粒和抗非人灵长类 CD3 以及人 CD2 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用于模拟抗原递呈细胞，激活外周血单核细胞 (PBMC) 和纯化 T 细胞中的静息 T 细胞。T 细胞扩增是通过培养实现的，并在培养的第 14 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 CD2、CD3 和 CD28 的生物素化抗体可达到最佳活化效果。

▲ 注：如有需要，还可对生物素化抗体的其他组合进行试验，以确定其适用性。

加载的抗生物素磁珠颗粒随后用于激活 T 细胞。每两个细胞使用一个装载的抗生物素磁珠颗粒（颗粒与细胞的比例为 1:2）就能达到激活 T 细胞的最佳效果。细胞最多可培养 3 天，如果需要，还可进一步扩增。每隔 2-3 天加入 IL-2 和新鲜培养基可实现扩增。在第 14 天时，以 1:2 的珠粒比加入额外的抗生物素磁珠颗粒，对细胞进行再刺激。

▲ T 细胞的激活效率取决于其分化状态，而分化状态通常是不一样的。因此，对于特殊应用，建议通过实验确定最佳刺激比例。

▲ 过度激活 T 细胞有可能导致活化诱导的细胞死亡。

使用抗生物素磁珠颗粒激活的 T 细胞可用于细胞因子分析或免疫沉淀等任何下游处理。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 pH7.2 PBS、0.5% 牛血清白蛋白（BSA）和 2 mM EDTA 的溶液。将缓冲液置于 2-8 °C。使用前对缓冲液进行脱气处理，因为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,例如非人血清白蛋白、非人血清或胎牛血清。不建议使用含有  $\text{Ca}^{2+}$  或  $\text{Mg}^{2+}$  的缓冲液或培养基。

● X-VIVO 15™ 培养基 (Cambrex) , 添加 10% FCS。

● 注: 在细胞快速生长时, 可加入 2-Mercaptoethanol (0.01 mM) 以保持细胞活力。

● T 细胞扩增袋或带盖平底细胞培养板。

● 加湿培养箱。

● 用于加载磁珠颗粒的样品混悬仪。

● (可选) 分离器, 用于在下游实验前, 在 T 细胞扩增后去除抗生物素磁珠颗粒。

▲ 注意: 请勿使用 xM、xL 分选柱。

● (可选) 用于流式细胞分析的荧光染料偶联的 REAfinity™ 抗体, 如 CD4 抗体、CD8 抗体、CD25 抗体、CD69 抗体。

● (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) 相应的 MACS 细胞因子, 如人 IL-2 IS。

## [步骤]

方案中的所有步骤都必须是在无菌条件下进行。

### 一、样本准备

在处理抗凝外周血或白膜层时, 应使用密度梯度离心法分离外周血单核细胞 (PBMC) , 例如使用 Ficoll-Paque™ 方法。

▲注:密度梯度分离后除去血小板,将细胞重悬于缓冲液中,在 200×g 下 20°C 离心 10-15 分钟。小心抽吸上清。重复洗涤步骤。

当处理组织或裂解血液时,使用标准方法制备单细胞悬浮液。

▲注:死细胞可能与磁珠非特异性结合。为了去除死细胞,我们建议使用密度梯度离心或死细胞去除试剂盒。

## 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  $1 \times 10^8$  个抗生物素磁珠颗粒为一批加载抗生物素磁珠颗粒。已加载的抗生物素磁珠颗粒在 2-8 °C 下可稳定保存 4 个月。

1. 将 100 μL CD2-生物素、100 μL CD3-生物素和 100 μL 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中每种抗体 10 μg,是为实现最大 T 细胞活化而优化的。

2. 涡旋充分重悬抗生物素磁珠颗粒。

3. 取出 500 μL 抗生物素磁珠颗粒 ( $1 \times 10^8$  抗生物素磁珠颗粒) 并加入到抗体混合物中。

4. 加入 200 μL 缓冲液,使总体积达到 1 mL。

▲ 注意：抗生物素磁珠颗粒可以灵活地加入生物素化抗体或配体。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总体积为 1 mL。

5. 使用样品混悬仪，以大约 4 转/分（最慢的永久运行程序）在 2-8 °C 温度下持续、温和地旋转，孵育 2 小时。

6. 加载的抗生物素磁珠颗粒（ $1 \times 10^8$  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 细胞活化步骤

该 T 细胞活化方案针对 PBMC 的强活化进行了优化，每两个 PBMC 或 T 细胞使用一个装载的抗生物素磁珠颗粒（颗粒与细胞的比例为 1:2）。在激活纯化的 T 细胞时，建议使用相同的磁珠颗粒与细胞比例。

▲ 注：其他应用可能需要每细胞 1:2 以外的负载抗生物素磁珠颗粒比例（另见背景信息）。

▲ 下面给出的是  $5 \times 10^6$  PBMC 的活化体积。如细胞总数为  $1 \times 10^7$ ，则所有试剂体积和总体积均应增加一倍。

▲ 对于纯化 T 细胞的活化，每毫升每平方厘米培养  $2.5 \times 10^6$  个 T 细胞。

1. 彻底重悬已加载的抗生物素磁珠颗粒，并将每  $5 \times 10^6$  PBMCs 25  $\mu$ L（ $2.5 \times 10^6$  已加载的抗生物素磁珠颗粒）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  $5 \times 10^6$  PBMCs 加入 12.5  $\mu$ L（ $2.5 \times 10^6$  粒）未加载的抗生物素磁珠颗粒，以取代已加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 100-200  $\mu$ L 培养液， $300 \times g$  离心 5 分钟。

3. 完全吸去上清液，并将载入的抗生物素磁珠颗粒重悬于 100  $\mu\text{L}$  新鲜培养液中。
4. 以每 900  $\mu\text{L}$  X-VIVO 15™ 培养基  $5 \times 10^6$  细胞的密度重悬 PBMC，并添加 10% FCS。
5. 将步骤 3 中制备的抗生物素磁珠颗粒加入到 900  $\mu\text{L}$  细胞悬液中并充分混合。
6. 按每毫升每平方厘米  $5 \times 10^6$  细胞的密度将混合物加入合适的细胞培养容器中。
7. 在 37 °C、5-10%  $\text{CO}_2$  条件下培养 3 天。

▲ 注：每天检查培养物，必要时添加新鲜培养基。

8. 如需扩增 T 细胞，请执行 T 细胞扩增方案的第 2 步（见第四节）。免疫荧光染色见第五节。

#### 四、T 细胞扩增方案

随着 T 细胞的激活和扩增，需要添加更多的生长因子和刺激物，如更多的抗生物素磁珠颗粒。以下程序是刺激和扩增 T 细胞的指南。

▲ 每天检查细胞培养。根据扩增速度，可能需要每 2-3 天拆分一次培养物。

1. 按照第三节（T 细胞活化方案）所述步骤 1-7 执行。
2. 第 3 天时，轻轻上下移动培养液，使细胞团块破裂。
3. 计数 T 细胞，加入每毫升含 100 单位 rIL-2 的培养基，将细胞稀释至每毫升  $1-2 \times 10^6$  T 细胞。

在 37 °C、5-10%  $\text{CO}_2$  下培养。

▲ 注意：如果 rIL-2 会干扰下游实验，则可以省略。但是，省略会降低细胞活力。

4. 每天检查细胞培养，培养细胞至第 14 天。

▲ 注：如有必要，分层培养，加入每毫升 100 单位 rIL-2 的新鲜培养基。

5. 第 14 天，将细胞以每毫升  $2.5 \times 10^6$  个的量重悬在每毫升添加 100 单位 rIL-2 的新鲜培养基中。

6. 为了延长扩增时间，现在每两个细胞加入一个加载的抗生物素磁珠颗粒对细胞进行再刺激：计数细胞，然后每  $2.5 \times 10^6$  T 细胞加入 12.5  $\mu\text{L}$  加载的抗生物素磁珠颗粒。
7. 进一步培养细胞，每 2-3 天重复步骤 2 和 3。
8. 进行下游应用，如细胞分析。

▲ 注意：免疫荧光染色不需要去除抗生物素磁珠颗粒。对于需要 T 细胞在进一步刺激前恢复到完全静息状态的检测，应在重新刺激前至少 24 小时去除抗生物素磁珠颗粒（见第六节）。

## 五、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。

▲ 在长达 24 小时的短期刺激后，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。

▲ 受刺激后，CD3 的表达可能会短暂下调。因此，活化细胞表面 CD3 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时（最长 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. 加入 1-2 mL 缓冲液清洗细胞，如  $10^6$ ，然后  $300 \times g$  离心 10 分钟。完全吸出上清液。
3. 用缓冲液重悬细胞，并根据制造商的建议添加染色抗体。
4. 混匀，放入冰箱（2-8  $^{\circ}\text{C}$ ）暗处孵育 10 分钟。

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

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。

## 六、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  $2\times 10^7$  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。