

T 细胞增殖的流式检测 (CFSE 稀释法)

Analyzing T Cell Proliferation through CFSE Dilution Assay

戚馨月, 杨选明*

生命科学技术学院, 上海交通大学, 闵行, 上海

*通讯作者邮箱:xuanmingyang@sjtu.edu.cn

引用格式: 戚馨月, 杨选明. (2019). T 细胞增殖的流式检测 (CFSE 稀释法). *Bio-101* e1010313.

Doi: 10.21769/BioProtoc.1010313.

How to cite: Qi, X. Y. and Yang, X. M. (2019). Analyzing T cell Proliferation through CFSE Dilution Assay. *Bio-101* e1010313. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010313. (in Chinese)

摘要: Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester (CFSE 羧基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺酯) 染色法, 是一种检测细胞分裂的方法。CFSE 能够轻易穿透细胞膜, 被细胞内的酯酶除去醋酸酯组分后产生荧光, 而未进入细胞的 CFSE 无荧光 (Quah 等, 2007)。荧光态的 CFSE 与细胞内的氨基共价结合, 偶联到蛋白上, 伴随细胞分裂过程, 平均分配到子代细胞中, 子代细胞荧光强度减少一半。荧光强度随子代细胞分裂而递减, 通过流式细胞技术, 能够检测荧光强度递减产生的不同荧光强度的峰, 可以监测细胞分裂状态, 检测细胞增殖情况 (Fulcher 和 Wong, 1999)。以体外 OTII 多肽刺激小鼠脾脏细胞为例, 用 CFSE 标记脾脏细胞, 添加刺激 T 细胞的 OTII 多肽, 体外培养脾脏细胞, 刺激其中的 T 细胞使其增殖, 流式细胞技术检测 T 细胞增殖情况。通过选取不同时间节点检测 T 细胞分裂状态, 验证 OTII 多肽对 T 细胞增殖的影响。

关键词: CFSE 稀释法, T 细胞增殖, 流式细胞技术

材料与试剂

1. Cell strainer 70 μ m (Falcon, catalog number: 352350)
2. 96 孔细胞培养板 (Jet Biofil, catalog number: 011096)
3. 35 mm 细胞培养皿 (Corning, catalog number: 430165)
4. 离心管 (15 ml, 50 ml) (Jet Biofil, catalog numbers: CFT011150, CFT011550)
5. 移液管 (5 ml, 10 ml) (Jet Biofil, catalog numbers: GSP010005, GSP010010)

6. 1 ml 注射器 (上海康德莱企业发展集团股份有限公司)
7. TCR 转基因 OTII 小鼠 (Jackson Lab)
8. Anti-CD16/32 (clone 2.4G2) (BioLegend, catalog number: 101301)
9. APC anti-mouse CD3 ϵ (BioLegend, catalog number: 100312)
10. FBS (Gibco, catalog number: 10270)
11. OTII (上海强耀生物科技有限公司合成)
12. IL-2 (北京四环生物制药有限公司, catalog number: 国药准字 S10970018)
13. PBS (Hyclone, catalog number: SH30256.01)
14. RPMI-1640 (Hyclone, catalog number: SH30809.01)
15. Penicillin/Streptomycin (Hyclone, catalog number: SV30010)
16. L-Glutamine (Amresco, catalog number: 0374)
17. β -ME (Amresco, catalog number: 0482)
18. CFSE (Invitrogen, catalog number: C1157)
19. DMSO (Sigma-Aldrich, catalog number: 101871790)
20. 10 \times Lysing buffer (BD Bioscience, catalog number: 555899)
21. NaCl (Sigma-Aldrich, catalog number: V900058-500g)
22. KCl (Sigma-Aldrich, catalog number: V900068-500g)
23. Na₂HPO₄ (Sigma-Aldrich, catalog number: V900060-500g)
24. KH₂PO₄ (Sigma-Aldrich, catalog number: V900041-500g)
25. NaN₃ (Amresco, catalog number: 0639-250g)
26. RPMI 完全培养基 (见溶液配方)
27. OTII 多肽溶液 (见溶液配方)
28. CFSE 溶液 (见溶液配方)
29. 1 \times lysing buffer (见溶液配方)
30. 10 \times PBS (1 L, pH = 7.3) (见溶液配方)
31. FACS buffer (见溶液配方)
32. Stain mixture (见溶液配方)

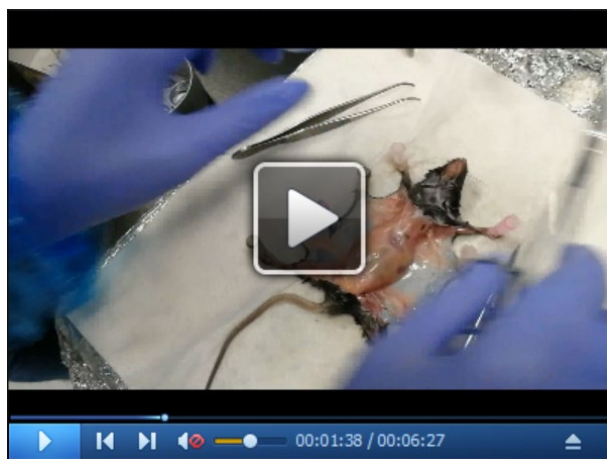
仪器设备

1. 离心机 (Eppendorf, model: Centrifuge 5810)
2. Vortex 振荡器 (Kylin-bell)

3. 流式细胞仪 (Beckman Coulter, model: Cytotflex S)
4. 移液器 (Eppendorf)
5. 高压灭菌锅 (Boxun, model: YXQ-LS-100S11)

实验步骤

1. 断颈处死小鼠，用 70%酒精消毒处理，取出小鼠脾脏，置于 70 μ m cell strainer 上；
2. 将装有脾脏的 cell strainer 置于 35 mm 的细胞培养皿中，然后加入 4 ml 的完全培养基，使用平底的 1 ml 注射器进行脾脏研磨；
3. 研磨释放脾脏细胞，将脾脏细胞悬液放入 50 ml 离心管，再次加入 4 ml RPMI 完全培养基，冲洗 cell strainer，细胞悬液同样放入 50 ml 离心管；
4. 450 x g 离心 5 min，弃去上清；
5. 红细胞裂解，加入 2 ml 1 \times lysing buffer，室温放置 2 min；
注：若脾脏较小，可选择用 1 ml 1 \times lysing buffer，或裂解红细胞 1 min。
6. 加入 20 ml 1 \times PBS，中和裂解液，450 x g 离心 5 min，弃去上清；
7. 细胞计数，用于后续实验，参见视频 1；



视频 1. 脾脏研磨获取单细胞悬液

8. 按照所需要的细胞总量进行细胞重悬：
若细胞总数小于 5×10^7 ，离心，1 ml 2% FBS/PBS 重悬，放置于 15 ml 离心管中，
若细胞总数大于 5×10^7 ，离心，PBS 重悬至 5×10^7 /ml，放置于 15 ml 离心管中；
9. 用 1 \times PBS 稀释 CFSE 至 10 μ M (2 \times)；

10. 将等体积的 10 μ M CFSE 加入至待标记的脾脏细胞悬液中，终浓度为 5 μ M，立即 vortex 混匀，包上铝箔纸，室温放置 7 min；
注：若细胞量较少，可以降低 CFSE 浓度，如终浓度降至 2 μ M，或者减少标记时间至 5 min。
11. 加入 10 ml RPMI 完全培养基，vortex 混匀，室温放置 2 min，450 x g 离心 5 min，弃去上清；
12. 重复步骤 11；
13. 用含 IL-2 的 RPMI 完全培养基重悬脾脏细胞至 5×10^6 /ml，每孔 100 μ l 加入 96 孔板，即每孔细胞数为 5×10^5 ，参见视频 2；



视频 2. 脾脏细胞 CFSE 染色

14. OTII 多肽刺激，用含 IL-2 的 RPMI 完全培养基稀释 OTII 至 20 μ g/ml (2 \times)，每孔 100 μ l 加入 96 孔板中，终浓度为 10 μ g/ml，每孔总体积为 200 μ l，放入细胞培养箱培养；
注：设置对照实验，需要同时做：脾脏细胞被 CFSE 标记且刺激的，即实验组；CFSE 标记但不刺激的，用来比较有无刺激 T 细胞的增殖状况；未标记且刺激的和未标记但不刺激的，用来确定脾脏细胞的荧光本底值，确定阳性范围。
15. 分别在第 24 h、48 h、72 h、96 h 取细胞用于流式检测，加入 150 μ l/sample FACS buffer，500 x g，离心 3 min，去上清；
16. 加入 50 μ l anti-CD16/32 (clone 2.4G2) (200 ng/ml)/sample 进行 Fc 受体封闭，4 $^{\circ}$ C 放置 20 min，封闭结束后，加入 150 μ l/sample FACS buffer，500 x g，离心 3 min，

去上清;

17. 准备流式抗体 APC anti-mouse CD3 ϵ , 按照 0.15 μ l APC anti-mouse CD3 ϵ (0.2 mg/ml) + 50 μ l FACS buffer/sample 稀释抗体;
18. 将稀释好的流式抗体加入样品中, 50 μ l/sample, vortex 混匀, 4 °C 避光放置 25 min;
19. 加入 150 μ l/sample FACS buffer, 500 x g, 离心 3 min, 去除上清后, 60 μ l/sample FACS buffer 重悬, 进行流式检测, 参见视频 3。



视频 3. 流式样品处理

结果与分析

多肽 OTII 刺激后进行流式分析, 先通过 FSC-A, SSC-A 确定脾脏细胞群 (样品脾脏细胞都表达 CD45, 可不染 CD45, 其他样品可进行 CD45 染色, 确定淋巴细胞群), 再画出 T 细胞群 (即 mouse CD3⁺ 细胞), 选择这群 CD3⁺细胞进行 CFSE 荧光强度分析 (图 1)。

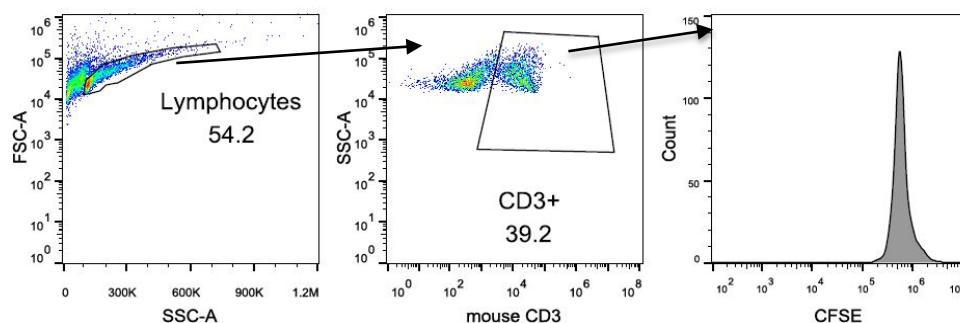


图 1. 流式检测 T 细胞 CFSE 荧光强度

未被 CFSE 标记的脾脏细胞样品，选择 CD3⁺细胞群分析 CFSE 荧光强度，如图 2:

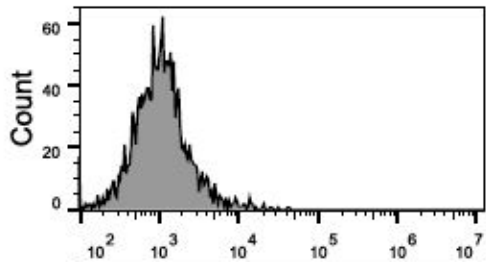


图 2. 未标记 T 细胞 CFSE 荧光强度

CFSE 标记后的脾脏细胞，选择 CD3⁺细胞群分析，左侧图为加入 OTII 多肽刺激后的流式图，右侧图为无刺激的流式图，从上至下分别为刺激 (左侧) 或培养 (右侧) 24 h、48 h、72 h、96 h 的细胞增殖情况，如图 3 所示:

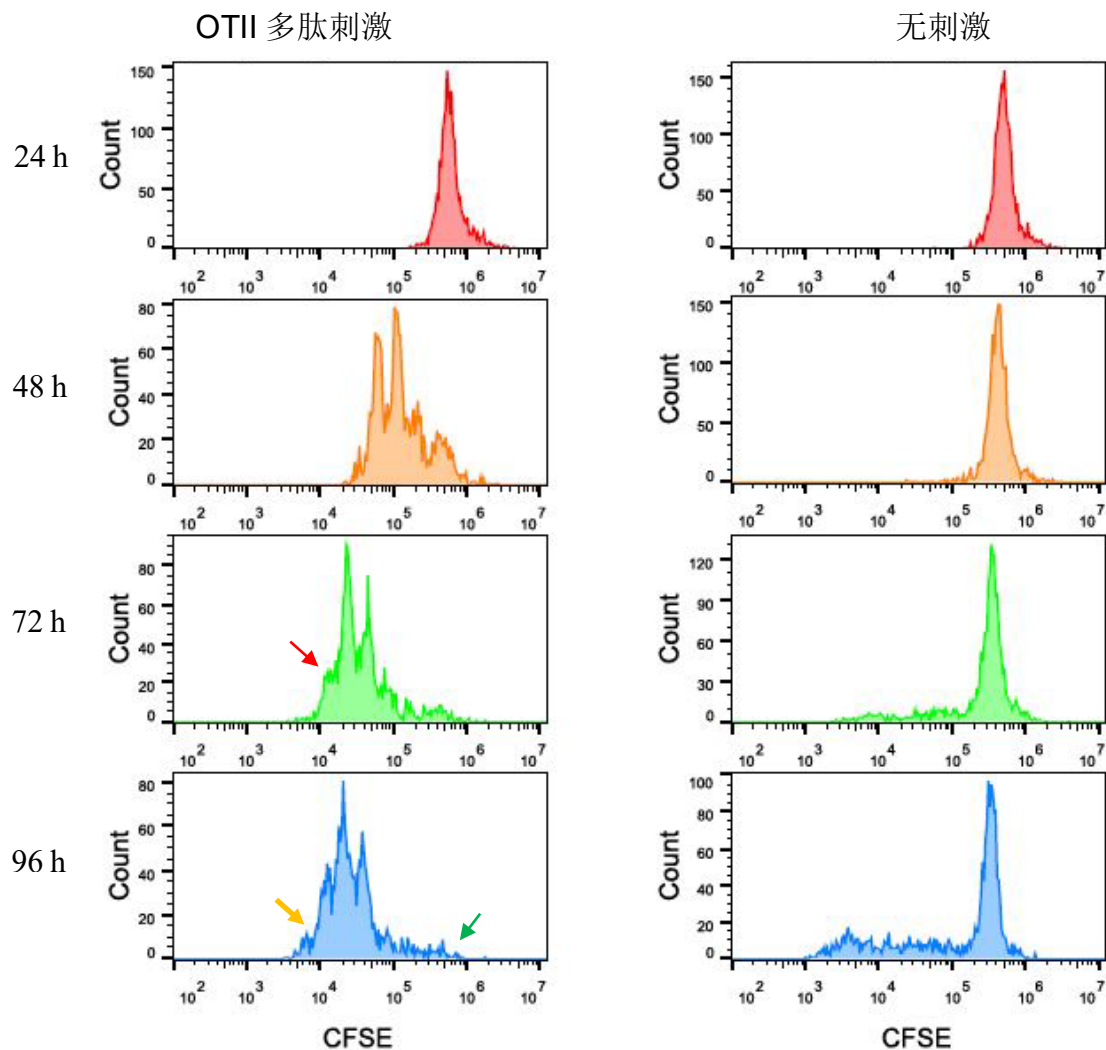


图 3. 流式检测 OTII 多肽刺激 (左) 与无刺激 (右) T 细胞 CFSE 荧光强度

OTII 刺激脾脏细胞 24 h 时，未见不同荧光强度的峰，只有单一 CFSE 高强度峰，此时 T 细胞还未大量增殖；从第 48 h 起，开始检测到 T 细胞分裂，出现三个连续荧光强度的峰；第 72 h，在之前的基础上出现一个新的荧光强度低一级的峰 (图 3 红色箭头所示)；第 96 h，又一次出现荧光强度低一级的峰 (图 3 橙色箭头所示)，原始 CFSE 高强度的峰逐渐消失 (图 3 绿色箭头所示)，证明 T 细胞持续分裂与 CFSE 标记细胞增殖实验的可行性。

对比未加入 OTII 刺激的脾脏细胞，并没有连续 CFSE 递减的峰出现，说明在无抗原肽刺激的情况下，T 细胞增殖不明显。

失败经验

1. 进行 CFSE 标记时，加入 CFSE 染料一定要均匀，确保每个细胞标记 CFSE 的强度一致；
2. 尽量使用原代细胞完成实验，培养时间久的细胞再次刺激分裂能力较弱，CFSE 标记后出现递减荧光强度峰的数量会减少；
3. 当细胞数量少时，用 2% FBS/PBS 重悬细胞，并降低 CFSE 工作浓度，缩短标记时间，可以减少 CFSE 对细胞的损伤，保持细胞分裂能力；
4. 若对刚标记完的细胞进行流式检测，会发现 CFSE 的荧光强度很高但不稳定，18 h 后会恢复到稳定的荧光强度；
5. 选择与 CFSE (FITC) 无补偿的荧光颜色标记 CD3，方便流式检测；
6. 随着 T 细胞的活化，mouse CD3 信号会减弱，选择 T 细胞群时，需要根据实际读出的 CD3 的位置画门，确定 T 细胞群。

溶液配方

1. RPMI 完全培养基

RPMI-1640	500 ml
FBS	60 ml
Penicillin/Streptomycin	5.5 ml
L-glutamine (200 mM)	5.5 ml
β -ME (1 mol/l)	27.5 μ l
IL-2 (10^5 IU/ml)	280 μ l
2. OTII 多肽溶液

用 DMSO 溶解 OTII 多肽，至 20 mg/ml
3. CFSE 溶液

用 DMSO 溶解 CFSE，至 10 mM
4. 1 \times lysing buffer

10 \times lysing buffer 用经过高压蒸汽灭菌后的 ddH₂O 10 倍稀释，即得 1 \times lysing buffer
5. 10 \times PBS (1 L, pH=7.3)

NaCl	80 g
KCl	10 g

Na₂HPO₄ 14.4 g

KH₂PO₄ 2.4 g

将上述试剂加入 800 ml ddH₂O 依次溶解，待所有试剂完全溶解后，加入 ddH₂O 定容至 1 L，高压蒸汽灭菌，冷却后室温保存待用

6. FACS buffer

10× PBS 100 ml

FBS 10 ml

NaN₃ (20%) 2.5 ml

使用量筒量取 100 ml 10× PBS，加入 800 ml ddH₂O 进行稀释，再加入 10 ml FBS 和 2.5 ml NaN₃ (20%)，混合均匀后，加入 ddH₂O 定容至 1 L，放入 4 °C 冰箱备用

7. Stain mixture

APC anti-mouse CD3ε (0.2 mg/ml) 0.15 μl

FACS buffer 50 μl

按照每个样品 50 μl 准备 stain mixture，50 μl FACS buffer 加入 0.15 μl 流式抗体 APC anti-mouse CD3ε (0.2 mg/ml)，混匀备用

致谢

感谢杨选明实验室全体成员的建议和帮助。该研究受国家自然科学基金 (81671643)、科技部重点研发计划 (2016YFC1303400) 资助。

参考文献

1. Fulcher, D. and Wong, S. (1999). [Carboxyfluorescein succinimidyl ester-based proliferative assays for assessment of T cell function in the diagnostic laboratory.](#) *Immunol Cell Biol* 77(6): 559-564.
2. Quah, B. J., Warren, H. S. and Parish, C. R. (2007). [Monitoring lymphocyte proliferation *in vitro* and *in vivo* with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester.](#) *Nat Protoc* 2(9): 2049-2056.