

胞内染色法检测 T 细胞活化产生的细胞因子

Analyzing Cytokines Production during T Cell Activation by Flow Cytometry Intracellular Staining

韩萍, 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: 韩萍, 杨选明. (2019). 胞内染色法检测 T 细胞活化产生的细胞因子. *Bio-101* e1010314.

Doi: 10.21769/BioProtoc.1010314.

How to cite: Han, P. and Yang, X. M. (2019). Analyzing Cytokines Production during T Cell Activation by Flow Cytometry Intracellular Staining. *Bio-101* e1010314. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010314. (in Chinese)

摘要: T 细胞经过抗原刺激活化后, 会发生一系列的变化 (Yang 等, 2014a 和 2014b; Pu 等, 2016), 如表达表面活性分子、产生特定的细胞因子、细胞增殖分裂及细胞凋亡等, 利用流式细胞仪可以在单细胞水平上对其进行多参数检测 (Yang 等, 2014b), 如: 活化 T 细胞的表面分子 (如 CD44、CD69 等) 及其相应的效应分子 (如 Granzyme B、IFN- γ 及 Perforin 等), 从而对抗原特异性免疫反应在细胞水平进行定性和定量分析。本次实验中, 我们利用含 OVA 模式抗原的小鼠黑色素瘤细胞 B16-OVA 对 OT-IT 细胞给予刺激, 24h 后检测胞内细胞因子 IFN- γ 的表达, 对照组 OT-IT 细胞无肿瘤细胞刺激。

关键词: 流式检测, T 细胞活化, 细胞因子, 胞内染色

材料与试剂

1. 96 孔板 (Jet Biofil, catalog number: TCP001096)
2. OT-I 小鼠 (Jackson Lab)
3. Anti-mCD8-AF700 (BioLegend, catalog number: 100730)
4. Anti-IFN- γ -APC (BioLegend, catalog number: 505810)
5. anti-CD16/32 抗体 (clone 2.4G2) (BioLegend, catalog number: 101301)
6. B16-OVA 细胞 (芝加哥大学 Hans Schreiber 馈赠)
7. FBS (Gibco, catalog number: 10270-106)

8. PBS (Hyclone, catalog number: SH30256.01B)
9. RPMI 1640 培养基 (Hyclone, catalog number: SH30027.01)
10. 双抗 Penicillin/Streptomycin (Hyclone, catalog number: SV30010)
11. 10x Permeabilization Buffer (eBioscience, catalog number: 00-8333-56)
12. BFA (Brefeldin A) (BioLegend, catalog number: 420601)
13. 多聚甲醛 (Adamas, catalog number: 46556A)
14. NaCl (Sigma-Aldrich, catalog number: V900058-500g)
15. KCl (Sigma-Aldrich, catalog number: V900068-500g)
16. Na₂HPO₄ (Sigma-Aldrich, catalog number: V900060-500g)
17. KH₂PO₄ (Sigma-Aldrich, catalog number: V900041-500g)
18. NaN₃ (Amresco, catalog number: 0639-250g)
19. NaOH (Sigma-Aldrich, catalog number: V900797)
20. 10× PBS (1 L, pH = 7.3) (见溶液配方)
21. FACS buffer (见溶液配方)
22. 4%多聚甲醛 (见溶液配方)

仪器设备

1. 生物安全柜 (LabGard, model: Class II/Labconco)
2. 离心机 (Eppendorf, model: 5810R)
3. 光学显微镜 (Olympus, model: IX2-SLP)
4. 流式细胞仪 (Backman Coulter, model: CytoFLEX S)
5. 移液器 (Eppendorf)
6. 二氧化碳培养箱 (Panasonic, model: MCO-20AIC)
7. 高压蒸汽灭菌锅 (Boxun, model: YXQ-LS-100SII)

软件

1. FlowJo 软件

实验步骤

1. 获取 OT-I 小鼠的脾脏细胞，计数，按照 $1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^5$ 接种于 96 孔板，培养基为含 IL-2 的 RPMI 完全培养基，按照 (OT-I 小鼠的脾脏细胞: B16-OVA 肿瘤细胞) E:T = 3:1 的比例加入 B16-OVA 肿瘤细胞刺激，对照组不加肿瘤细胞；
2. 刺激后约 20 h，加入 BFA 反应 2.5 h~4 h，用排枪吸取悬浮细胞悬液加入新的 96 孔板 (U 型)，500 x g 离心 3 min，弃去上清；
3. 加入 FACS buffer，200 μ l/sample，500 x g 离心 3 min，弃去上清；
4. 细胞表面分子染色，单份样品抗体用量如下，按照 50 μ l/sample 加入样品，适度混匀，4 °C 孵育 25 min：
25 μ l FACS buffer
25 μ l 2.4G2 (200 ng/ml)
0.15 μ l anti-mCD8-AF700；
5. 加入 FACS buffer 150 μ l/sample，500 x g 离心 3 min，弃去上清；
6. 重复第 5 步；
7. 细胞固定，按照 100 μ l/sample 标准加入 4% PFA 固定，加入后立即使用移液器反复吹打混匀防止细胞结块，室温孵育 15 min；
8. 加入 FACS buffer 150 μ l/sample，500 x g 离心 3 min，弃去上清；
9. 重复第 8 步；
10. 破膜处理，新鲜配制 1x Permeabilization Buffer，按照 200 μ l/sample 加入 1x Permeabilization Buffer，用移液器吹打重悬细胞，室温 15 min，破膜完成后，500 x g，离心 3 min，去上清；
11. 胞内细胞因子染色，单份样品抗体用量如下，并按照 50 μ l/sample 加入样品，适度混匀，4 °C 孵育 25 min：
50 μ l 1x Permeabilization Buffer
0.15 μ l anti-IFN- γ -APC；
12. 加入 1x Permeabilization Buffer 150 μ l/sample，500 x g 离心 3 min，弃去上清；
13. 用 FACS buffer 重悬样品 (70 μ l/sample)，将样品置于冰上；
14. 使用流式细胞仪分析获取数据，利用 FlowJo 软件分析流式检测结果。

结果与分析

胞内染色法检测 T 细胞活化引起的 IFN- γ 的表达情况

结果分析：图 1A 通过 FSC-A 和 SSC-A 分析排除死细胞和细胞碎片，确定和收集主要细胞群；图 1B 进一步通过 APC-A700-A 染色确定 CD8⁺ T 细胞；图 1C~1D 在图 1B 基础上通过 APC-A 染色确定 IFN- γ 的表达。

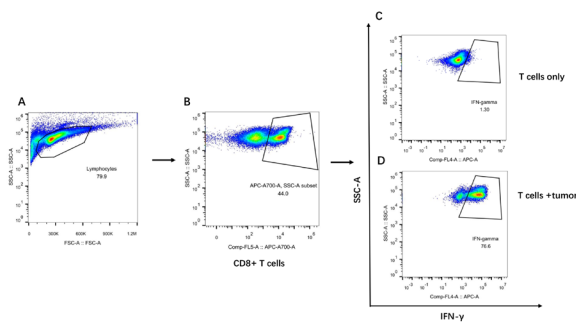


图 1. 胞内染色检测活化 T 细胞释放 IFN- γ 的情况

注意事项

1. 该实验中的 200 ng/ml 为 2.4G2 抗体最终浓度；抗体 Anti-mCD8-AF700 及 Anti-IFN- γ -APC 具有光谱重叠需要预先在流式细胞仪上调好补偿，多色共染时对于抗体的选择需要注意，要尽量减少光谱重叠，例如两色共染时可选择 APC + FITC 标记或者 APC + AF488 标记，这样可以有效避免光谱重叠。
2. 本实验中也可以收集 24 h 时细胞上清，利用 ELISA 或 CBA 的方法检测上清中分泌 IFN- γ 的表达，胞内染色的优点在于能够明确产生 IFN- γ 的细胞类型，此外，其他效应分子如 Granzyme B、Perforin 及 TNF- α 等也可以用同样的胞内染色方法进行流式检测。

溶液配方

1. 10 \times PBS (1 L, pH=7.3)

NaCl	80 g
KCl	10 g
Na ₂ HPO ₄	14.4 g
KH ₂ PO ₄	2.4 g

将上述试剂加入 800 ml ddH₂O 依次进行溶解，待所有试剂完全溶解后，高温湿热灭菌，冷却后室温保存待用

2. FACS buffer

10× PBS	100 ml
FBS	10 ml
20% NaN ₃	2.5 ml

使用量筒取 100 ml 10× PBS，首先加入 800 ml ddH₂O 进行稀释，再加入 10 ml FBS 和 2.5 ml 20% NaN₃，混合均匀后，加入 ddH₂O 定容至 1 L，4 °C 备用

3. 4%多聚甲醛

多聚甲醛	4.0 g
PBS	100 ml

称量 4.0 g 多聚甲醛，先加入 80 ml 已配制好的 1× PBS 在 60~65 °C 加热搅拌溶解，20 分钟后，使用 NaOH 调节 pH 至 7.0，待溶液呈现清亮，无未溶解固体成分，加入 PBS 定容至 100 ml，避光保存于 4 °C 待用

注：甲醛具有较强的毒性，注意做好防护措施。

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。本实验方案用于已发表的文章 Han 等，2019；Qi 等，2019；Zhang 等 2019。

参考文献

1. Han, P., Dai, Q., Fan, L., Lin, H., Zhang, X., Li, F. and Yang, X. (2019). [Genome-wide CRISPR screening identifies JAK1 deficiency as a mechanism of T-Cell resistance](#). *Front Immunol* 10: 251.
2. Pu, Y., Xu, M., Liang, Y., Yang, K., Guo, Y., Yang, X. and Fu, Y. X. (2016). [Androgen receptor antagonists compromise T cell response against prostate cancer leading to early tumor relapse](#). *Sci Transl Med* 8(333): 333ra347.
3. Qi, X., Li, F., Wu, Y., Cheng, C., Han, P., Wang, J. and Yang, X. (2019). [Optimization of 4-1BB antibody for cancer immunotherapy by balancing agonistic strength with FcγR affinity](#). *Nat Commun* 10(1): 2141.

4. Yang, X., Zhang, X., Fu, M. L., Weichselbaum, R. R., Gajewski, T. F., Guo, Y. and Fu, Y. X. (2014a). [Targeting the tumor microenvironment with interferon-beta bridges innate and adaptive immune responses.](#) *Cancer Cell* 25(1): 37-48.
5. Yang, X., Zhang, X., Sun, Y., Tu, T., Fu, M. L., Miller, M. and Fu, Y. X. (2014b). [A BTLA-mediated bait and switch strategy permits *Listeria* expansion in CD8 \$\alpha\$ \(+\) DCs to promote long-term T cell responses.](#) *Cell Host Microbe* 16(1): 68-80.
6. Zhang, X., Cheng, C., Hou, J., Qi, X., Wang, X., Han, P. and Yang, X. (2019). [Distinct contribution of PD-L1 suppression by spatial expression of PD-L1 on tumor and non-tumor cells.](#) *Cell Mol Immunol* 16(4): 392-400.