Human Th1/Th2 Flow Cytometry Staining Kit

Cat. No: XJH001 **Size: 20 Assays/100 Assays**

试剂盒组分

产品编号	试剂名称	20 Assays	100 Assays	Storage
XJH001A	Human Th1/Th2 Cytokine Detection Antibody Cocktail	200 μL	1 mL	2~8°C, shading light
XJH001B	Human Th1/Th2 Cytokine Detection Antibody Isotype Cocktail	200 μL	1 mL	2~8°C, shading light
E-CK-A011	Cell Stimulation MIX Powder (50 μg)	50 μg	50 μg×3	-20°C/-80°C, shading light
E-CK-A012	Cell Stimulation MIX Solvent	120 μL	360 μL	-20°C, shading light
E-CK-A013	Protein Transport Inhibitor MIX Powder (200 μg)	200 μg	200 μg×3	-20°C/-80°C, shading light
E-CK-A109A	Fixation Buffer	10 mL	10 mL	2~8°C
E-CK-A109B	Permeabilization Buffer (5×)	15 mL	50 mL	2~8°C
	说明书		一份	

组分组成

试剂名称	产品名称
Human Th1/Th2 Cytokine Detection Antibody Cocktail	PerCP/Cyanine5.5 Anti-Human CD3 Antibody[OKT-3]
	Elab Fluor® 488 Anti-Human CD4 Antibody[SK3]
	APC Anti-Human IFN-γ Antibody[B27]
	PE Anti-Human IL-4 Antibody[MP4-25D2]
Human Th1/Th2 Cytokine Detection Antibody Isotype Cocktail	PerCP/Cyanine5.5 Anti-Human CD3 Antibody[OKT-3]
	Elab Fluor® 488 Anti-Human CD4 Antibody[SK3]
	APC Mouse IgG1, κ Isotype Control[MOPC-21]
	PE Rat IgG1, κ Isotype Control[HRPN]

注：不同批次试剂盒中Cocktail组分不建议混合使用。

保存条件

1. 本试剂盒中各试剂在推荐条件下可保存 12 个月。
2. Cell Stimulation MIX 和 Protein Transport Inhibitor MIX 干粉试剂-20°C 避光可保存 1 年，-80°C避光可保存 2 年，干粉溶解后可-20°C避光保存 6 个月，也可以分装后-80°C避光保存 1 年。

产品介绍

Elabscience® Human Th1/Th2 Flow Cytometry Staining Kit可用于检测人抗凝血中Th1和Th2细胞在T淋巴细胞（或$CD4^+$辅助T细胞）中的比例。Th细胞，也称为辅助性T细胞（helper T cell），在静息状态（即未受刺激，如人的正常生理状态）下，Th0分化为Th1、Th2和Th17的能力非常弱，外周血中仅有极少量的Th1、

Th2和Th17细胞，而当Th细胞受到外界因素（如刺激素、病原体等）刺激，Th0就会向Th1、Th2或Th17分化，具体分化趋向取决于微环境中细胞因子的种类，此时，通过检测样本中IFN-γ、IL-4或IL-17A的表达量，可知Th1、Th2或Th17细胞在活化的T淋巴细胞中的比例。本产品提供一种四色荧光标记抗体混合物，这些抗体能特异性结合人CD3、CD4、IFN-γ（检测Th1）、IL-4（检测Th2），可通过多色流式检测Th1和Th2细胞。

通过试剂盒内的Cell Stimulation MIX刺激激活细胞分泌细胞因子，进一步通过阻断剂Protein Transport Inhibitor MIX将诱导分泌的细胞因子阻断在胞内。活化的T细胞经Fixation Buffer固定后，再使用Permeabilization Buffer进行细胞膜的充分透化，透化的同时可同步进行细胞表面/胞内抗原和抗体的结合，最后通过流式细胞仪检测活化T细胞的胞内因子分泌情况。Th细胞的表面标志为$CD3^+CD4^+$，正确设门选定$CD4^+$T细胞，进一步通过检测IFN-γ和IL-4抗体上不同荧光信号分析Th1和Th2细胞在活化的T淋巴细胞中的比例。

自备材料

1. 试剂

   RPMI-1640基础培养基、L-丙氨酰-L-谷氨酰胺溶液（200mM）、青霉素-链霉素溶液、胎牛血清、Cell Staining Buffer（E-CK-A107）或1×PBS、Ficoll分离液（1.077）、DMSO、10× ACK Lysis Buffer（E-CK-A105）、去离子水。

2. 仪器

   流式细胞仪、CO_2恒温培养箱、离心机。

试剂配制

1) 500× Cell Stimulation MIX

每管Cell Stimulation MIX Powder (50 μg) 中加入100 μL Cell Stimulation MIX Solvent，充分吹打混匀配制成500× Cell Stimulation MIX，-20℃避光保存。

注：使用前可以在2000~10000×g离心数秒后开盖使用。

2) 1000× Protein Transport Inhibitor MIX

每管Protein Transport Inhibitor MIX Powder (200 μg) 中加入50 μL预冷的33%DMSO溶液（自备），充分吹打混匀配制成1000× Protein Transport Inhibitor MIX，-20℃避光保存。

注：使用前可以在2000~10000×g离心数秒后开盖使用。33%DMSO溶液可使用670 μL无菌超纯水或无菌去离子水加入330 uL DMSO溶液混匀配制而成，配制后可-20℃避光保存。

3) 1× Permeabilization Buffer

使用前用去离子水将Permeabilization Buffer (5×)稀释5倍。

例如：取1 mL的Permeabilization Buffer (5×)，加入到4 mL去离子水中，充分混匀后的混合物即为1×Permeabilization Buffer。

注：1× Permeabilization Buffer建议现配现用，配制好的工作液尽量在3天内用完。

4) RPMI -1640 完全培养基

RPMI-1 640基础培养基，添加10%胎牛血清，1%抗生素（终浓度为100 U/mL的青霉素和0.1 mg/mL的硫酸链霉素），及终浓度为2 mM的L-丙氨酰-L-谷氨酰胺。配制的培养基可在4℃保存两周。

实验操作

➢ **分选的PBMC细胞样本**

注：第1~6步需无菌操作。

1. 用肝素钠抗凝管取 10 mL 新鲜人血，进入细胞房操作，整个分离过程需保持无菌。
   注：收集的新鲜人血需在1 h内进行分离，10 mL人血可通过分离获得约1×10^7个PBMC；Ficoll分选离心过程需在20 ± 2°C的条件下进行，温度过高可能会导致细胞得率降低，温度过低可能造成分离不彻底导致纯度降低。
2. 准备 2 个 15 mL 离心管，分别加入 5 mL Ficoll 分离液（1.077），再沿管壁缓慢加入 5 mL 新鲜人血（取血液前吹打混匀）；加完后不要混匀或晃动离心管，350×g 离心 20 min。
3. 吸弃最上面一层上清（约 1~2 mL），吸取第二层上清及少量第三层上清分选液，加到 50 mL 离心管中。
4. 加入 20 mL 的 RPMI-1640 基础培养基混匀，250×g 离心 5 min，弃上清。
   注：细胞沉淀一般为灰白色，若带有红色说明有少量血细胞残留，可直接使用或加入适量红细胞裂解液裂解红细胞获取目的细胞。
5. 加入适量的 RPMI-1640 完全培养基重悬细胞并计数，用完全培养基将细胞密度调整为 1×10^6 个/mL 并接种。
6. 参考下表加入 Cell Stimulation MIX 和 Protein Transport Inhibitor MIX，于 37°C、5%CO_2 培养箱中孵育 5 h，每 1~2 h 混匀一次。

实验分组	实验内容	加入抗体
阴性对照组	不做处理	XJH001A
实验组	每1 mL细胞悬液中同时加入2 μL Cell Stimulation MIX (500×)和1 μL Protein Transport Inhibitor MIX (1000×)	
同型对照组		XJH001B

在后续步骤中，不需要无菌操作。

7. 收集细胞，300×g 离心 5 min，弃上清，加入 1 mL Cell Staining Buffer 或 1×PBS 重悬，300×g 离心 5 min，弃上清。
8. 每 1×10^6 个细胞用 180 μL Cell Staining Buffer 或 1×PBS 重悬，然后加入 60 μL Fixation Buffer 充分混匀，于 4°C 固定过夜或于室温固定 1 h。
9. 固定后的细胞会沉降至 EP 管底部，吸弃上清，加入 1~2 mL 1× Permeabilization Buffer 混匀，500×g 离心 5 min，弃上清。
10. 加入 100 μL 1× Permeabilization Buffer 重悬细胞，按照上表分组分别加入 10 μL 抗体，室温避光孵育 60 min，每 15~20 min 混匀一次。
11. 孵育完成后，加入 1~2 mL Cell Staining Buffer 或 1×PBS 混匀，500×g 离心 5 min，弃上清。
12. 加入 100~200 μL Cell Staining Buffer 或 1×PBS 重悬细胞，上机检测。

检测指标	荧光素	最大激发波长（nm）	最大发射波长（nm）
CD3	PerCP/Cyanine5.5	440, 480, 675	675
CD4	Elab Fluor® 488	495	520
IFN-γ	APC	650	660
IL-4	PE	495, 565	575

➢ **人全血样本**

注:第1~2步需无菌操作。

1. 取新鲜的肝素钠抗凝血，每组加入 250 μL 抗凝血和 250 μL 不含血清的 RPMI-1640 基础培养基并混匀。
2. 参考下表加入 Cell Stimulation MIX 和 Protein Transport Inhibitor MIX，于 37°C、5%CO_2 培养箱中孵育 5 h，每 1~2 h 混匀一次。

实验分组	实验内容	加入抗体
阴性对照组	不做处理	XJH001A
实验组	加入1 μL Cell Stimulation MIX (500×)和0.5 μL Protein Transport Inhibitor MIX (1000×)	
同型对照组		XJH001B

在后续步骤中，不需要无菌操作。

3. 将各组细胞转移至 2 mL EP 管中，加入 1 mL Cell Staining Buffer 或 1×PBS 混匀，300×g 离心 5 min，弃上清。
4. 加入 100 μL Cell Staining Buffer 或 1×PBS 重悬细胞，然后加入 2 mL 的 1×ACK Lysis Buffer(E-CK-A105)，冰上裂解 2~3 min。300 g 离心 5 min。

   注：当溶液由浑浊变透亮即为裂解完成，请及时离心，避免裂解过度造成细胞损伤。
5. 加入 1mL Cell Staining Buffer 或 1×PBS 重悬细胞，300×g 离心 5 min，弃上清。
6. 加入 180 μL Cell Staining Buffer 或 1×PBS 重悬细胞，加入 60 μL Fixation buffer 充分混匀，于 4°C 固定过夜或于室温固定 1 h。
7. 固定后细胞会沉降至 EP 管底部，吸弃上清。加入 1~2 mL 1× Permeabilization Buffer 混匀，500×g 离心 5 min，弃上清。
8. 加入 100 μL 1× Permeabilization Buffer 重悬细胞，按照上表分组分别加入 10 μL 抗体，室温避光孵育 60 min，每 15~20min 混匀一次。
9. 孵育完成后，加入 1 mL Cell Staining Buffer 或 1×PBS 混匀，500×g 离心 5 min，弃上清。
10. 加入 100~200 μL Cell Staining Buffer 或 1×PBS 重悬细胞，上机检测。

检测指标	荧光素	最大激发波长（nm）	最大发射波长（nm）
CD3	PerCP/Cyanine5.5	440, 480, 675	675
CD4	Elab Fluor® 488	495	520
IFN-γ	APC	650	660
IL-4	PE	495, 565	575

注意事项

1. 本产品仅供科研使用。
2. Permeabilization Buffer (5×) 可能会出现沉淀，属于正常现象，不影响使用效果。

3. 收集新鲜人全血样本时，推荐使用肝素钠抗凝剂，EDTA 或类似能够螯合钙离子的抗凝剂会影响细胞因子的分泌效果。
4. 收集的新鲜人血在 1 h 内进行 PBMC 分离效果更佳，Ficoll 分选离心过程需在 20 ± 2°C的条件下进行，温度过高可能会导致细胞得率降低，温度过低可能造成分离不彻底导致纯度降低。
5. PBMC 分离过程，加血液前吹打混匀，将血液加于分层液上时，要避免冲散分层液面，而要使之形成良好的界面，否则影响分离结果。
6. 离心机升速和降速过高会引起细胞损失，建议调整升速不大于 3，降速不大于 2，即 Acc≦3，Dec≦2。
7. 荧光物质均易发生淬灭，在操作和存放过程中注意避光保存。
8. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

常见问题及解决方案

常见问题	可能原因	建议
淋巴细胞层中有红细胞污染	实验条件温度过低。	样本及试剂放置到20 ± 2°C再进行实验。
	离心速度过低。	适当增加离心的速度。
	离心时间过短。	适当增加离心时间。
淋巴细胞活性和得率较低	温度过高。	样本及试剂放置到20 ± 2°C再进行实验。
	血液样本放置时间过长。	使用新鲜血液分离以保证淋巴细胞的活性。
有粒细胞等污染	离心机没有配平。	在离心前需要配平。
	离心机结束时骤停，振动会导致淋巴细胞层和下层细胞混合。	设置速度缓降（降速≦2），让离心机缓慢停止。
未检测到细胞因子表达	细胞密度过大。	调整细胞密度到1~2×10^6个/mL。
	红细胞干扰。	正确使用Ficoll分离液（1.077），或者采取裂红的方法排除红细胞干扰。
	试剂失效。	合理保存试剂，并在有效期内使用。
	细胞固定破膜效果不佳。	根据说明书要求控制固定破膜时间。
	诱导时间不够。	通过设置梯度诱导时间，摸索最佳的反应时间。
胞内因子表达过高	细胞状态差，死细胞较多。	诱导前确保细胞状态良好，排除死细胞的干扰。
	抗体的非特异性结合。	增加抗体封闭流程，降低非特异性染色。
流式检测荧光信号弱	抗体量用量过少。	根据说明书要求用量加入抗体。
	抗体量染色时间过短。	根据说明书要求或适当延长抗体孵育时间。
	细胞过多。	降低细胞密度。
	目标蛋白表达水平很低。	可将目标细胞分选富集后再进行诱导检测。

结果示例

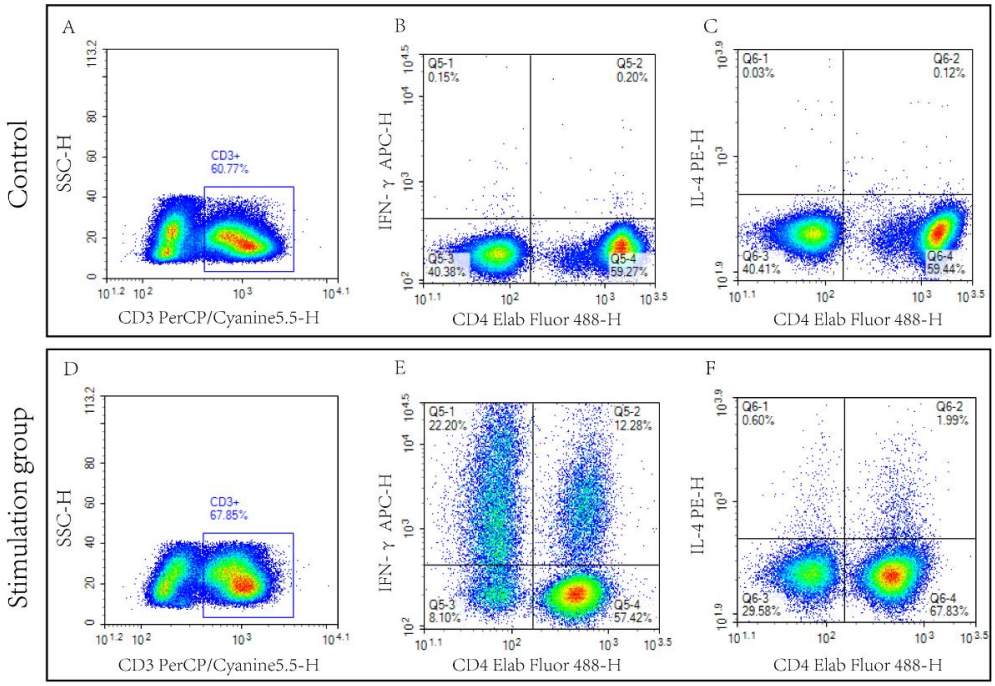

图1： 使用Human Th1/Th2 Flow Cytometry Staining Kit进行流式检测。正常PBMC细胞（Control）和经过Cell Stimulation MIX刺激的PBMC细胞（Stimulation group），$CD3^+$ $CD4^+$ IFN-γ^+细胞（Q5-2）为Th1细胞，$CD3^+$ $CD4^+$ IL-4^+细胞（Q6-2）为Th2细胞。