Human Th17 Flow Cytometry Staining Kit

Cat. No: XJH002 **Size: 20 Assays/100 Assays**

试剂盒组分

产品编号	试剂名称	20 Assays	100 Assays	Storage
XJH002A	Human Th17 Cytokine Detection Antibody Cocktail	200 μL	1 mL	2~8°C, shading light
XJH002B	Human Th17 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 Th17 Cytokine Detection Antibody Cocktail	PerCP/Cyanine5.5 Anti-Human CD3 Antibody[OKT-3]
	Elab Fluor® 488 Anti-Human CD4 Antibody[SK3]
	PE Anti-Human IL-17A Antibody[BL168]
Human Th17 Cytokine Detection Antibody Isotype Cocktail	PerCP/Cyanine5.5 Anti-Human CD3 Antibody[OKT-3]
	Elab Fluor® 488 Anti-Human CD4 Antibody[SK3]
	PE Mouse IgG1,κ Isotype Control[MOPC-21]

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 Th17 Flow Cytometry Staining Kit可用于检测人抗凝血中Th17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。本产品提供一种三色荧光标记抗体混合物，这些抗体能特异性结合人CD3、CD4、IL-17A，可通过多色流式实验检测Th17辅助细胞。

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IL-17A抗体上的荧光信号分析Th17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-1640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. 用肝素钠抗凝管收集 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℃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，加入到 50 mL 的离心管中。
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。

<table>
<tr><th>实验分组</th><th>实验内容</th><th>加入抗体</th></tr>
<tr><td>阴性对照组</td><td>不做处理</td><td rowspan="2">XJH002A</td></tr>
<tr><td>实验组</td><td rowspan="2">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×)</td></tr>
<tr><td>同型对照组</td><td>XJH002B</td></tr>
</table>

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
IL-17A	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	XJH002A
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		XJH002B

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
IL-17A	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。	适当的增加离心的速度。
	离心时间过短。	适当的增加离心时间。
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 1.077分选液，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

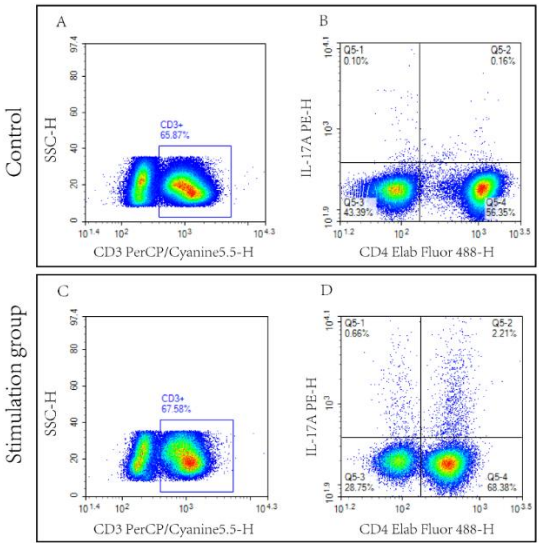

图1：使用Human Th17 Flow Cytometry Staining Kit进行流式检测。正常PBMC细胞（Control）和经过Cell Stimulation MIX刺激的PBMC细胞（Stimulation group），$CD3^+$ $CD4^+$ $IL\text{-}17A^+$细胞（Q5-2）为Th17细胞。