

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, 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, 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。

For Research Use Only

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、CO₂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°C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°C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 μL DMSO溶液混匀配制而成，配制后可-20°C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°C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1×10⁷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。

For Research Use Only

- 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。
- 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。
- 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。
- 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。
- 参考下表加入 Cell Stimulation MIX 和 Protein Transport Inhibitor MIX，于 37°C、5%CO₂ 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 | 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 | | XJH002B |

在后续步骤中，不需要无菌操作。

- 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。
- 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。
- 固定后的细胞会沉降于 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。
- 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。
- 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。
- 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。

- 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。
- 参考下表加入 Cell Stimulation MIX 和 Protein Transport Inhibitor MIX，于 37°C、5%CO₂ 培养箱中孵育 5

For Research Use Only

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 μ L Cell Stimulation MIX (500 \times)和 0.5 μ L | |
| 同型对照组 | Protein Transport Inhibitor MIX (1000 \times) | XJH002B |

在后续步骤中，不需要无菌操作。

- 将各组细胞转移至 2 mL EP 管中，加入 1 mL Cell Staining Buffer 或 1 \times PBS 混匀，300 \times g 离心 5 min，弃上清。
- 加入 100 μ L Cell Staining Buffer 或 1 \times PBS 重悬细胞，然后加入 2 mL 的 1 \times 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。
- 加入 1mL Cell Staining Buffer 或 1 \times PBS 重悬细胞，300 \times g 离心 5 min，弃上清。
- 加入 180 μ L Cell Staining Buffer 或 1 \times PBS 重悬细胞，加入 60 μ L Fixation buffer 充分混匀，于 4 $^{\circ}$ C 固定过夜或于室温固定 1 h。
- 固定后细胞会沉降于 EP 管底部，吸弃上清。加入 1~2 mL 1 \times Permeabilization Buffer 混匀，500 \times g 离心 5 min，弃上清。
- 加入 100 μ L 1 \times Permeabilization Buffer 重悬细胞，按照上表分组分别加入 10 μ L 抗体，室温避光孵育 60 min，每 15~20min 混匀一次。
- 孵育完成后，加入 1 mL Cell Staining Buffer 或 1 \times PBS 混匀，500 \times g 离心 5 min，弃上清。
- 加入 100~200 μ L Cell Staining Buffer 或 1 \times 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

- 本产品仅供科研使用。
- Permeabilization Buffer (5 \times) 可能会出现沉淀，属于正常现象，不影响使用效果。
- 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。
- 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 \pm 2 $^{\circ}$ 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。
- 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。
- 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 \leq 3，Dec \leq 2。
- 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。

For Research Use Only

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 $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 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 $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 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 $1\sim 2 \times 10^6$ 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

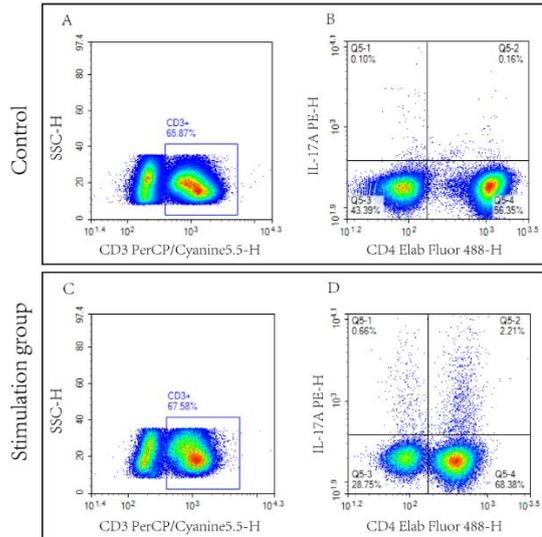


图1: 使用Human Th17 Flow Cytometry Staining Kit进行流式检测。正常PBMC细胞 (Control) 和经过Cell Stimulation MIX刺激的PBMC细胞 (Stimulation group), CD3⁺ CD4⁺ IL-17A⁺ 细胞 (Q5-2) 为Th17细胞。