



Th17 检测原理和样品处理方法

1. 背景介绍

我们通常所说的 Th1、Th2 和 Th17 是指 T 辅助细胞（严格意义上是 Th0 细胞）在各种生理与病理条件下分化为 Th1、Th2 和 Th17 的能力。静息状态（即未受任何刺激，如人的正常生理状态）下，Th0 分化为 Th1、Th2 和 Th17 的能力非常弱，所以外周血中仅含有极少量的 Th1、Th2 和 Th17 细胞，这时我们所能检测到的 IFN- γ 、IL-4、IL-17A 也微乎其微。而当 Th 细胞受到外界因素，如刺激素，病原体等刺激，其中 Th0 即会向 Th1、Th2 或 Th17 大量分化，具体分化趋向取决于细胞因子的种类。此时，我们检测到的 IFN- γ 、IL-4 或 IL-17A 也较多。实验中我们检测的 Th1、Th2 和 Th17 实际上是检测 Th 细胞对刺激素刺激的反应能力。

我们通常选用的刺激素为 PMA(佛波酯)+ Ionomycin(离子霉素)。

其中 PMA 为 PKC（蛋白激酶 C）的激活物，PKC 则可激活下游众多的蛋白激酶的磷酸化，形成级联反应，导致许多蛋白的表达，进而引起 T 细胞的活化。在细胞内，PKC 可被 DAG（二脂酰甘油）和 Ca^{2+} 的共同作用而激活，因此在 Ionomycin（ Ca^{2+} 的转运剂，可将细胞器内的 Ca^{2+} 转运至胞浆内）的参与下，T 细胞内 PKC 可被进一步激活。可见，PMA 与 Ionomycin 协同活化 T 细胞。

也有人选用其它刺激剂来活化 T 细胞，如 CD3/CD28 协同刺激，PHA 刺激等。实验表明，PMA 为广谱性刺激，即 T 细胞中的各亚群均会被 PMA 同等激活，而 CD3/CD28 协同刺激和 PHA 刺激，则是通过 TCR 受体的作用，仅对部分 T 细胞亚群有效。所以可根据实验的需要来选择刺激方式。

活化的 T 细胞可分泌多种细胞因子至细胞外，而流式细胞仪仅能检测细胞内的抗原，所以应阻断细胞因子分泌至细胞外。方法为破坏高尔基体（Golgi），因细胞因子（即各种蛋白）在合成后需经高尔基体的加工和转运，才能到达细胞膜，然后通过高尔基体膜与细胞膜的融合作用将细胞因子分泌至细胞外。因此破坏高尔基体即可切断细胞因子的转运途径，干扰其分泌。通常选用的阻断剂为 Brefeldin A (BFA, 布雷非德菌素 A)和/或 Monensin (莫能霉素)。

另外，实验过程中涉及到如何正确的选定 Th（即 T 辅助细胞）的问题。Th 细胞的表面





标志为 CD3+CD4+, 而当用 PMA 刺激 4 小时时, 会发现 CD4+的细胞明显减少, 甚至消失, 这是因为 PMA 会诱发细胞表面 CD4 分子被内吞。所以通常的做法是用 CD3 和 CD8 反设 CD4 细胞, 即 CD3+CD8-的细胞被认为是 CD3+CD4+的细胞。(注: PMA 对小鼠 CD4 的影响很小, 所以检测小鼠 Th1/Th2/Th17 时可用 CD4 直接设门)。

抗凝剂的选择也非常重要。使用肝素钠和肝素锂作为抗凝剂, 不影响 Th 细胞的活化和细胞因子的分泌, 而使用 EDTA 和枸橼酸钠作为抗凝剂则无法检测到细胞因子。此时, 应使用 PBMCs 而不是抗凝血进行刺激。

2. 实验步骤

【样本制备】

A. 全血标本

用肝素抗凝管采集静脉血 (必须用肝素钠抗凝, 不可用肝素锂、EDTA 或枸橼酸钠) 1-2ml, 血液室温或 4°C 放置, 8 小时内必须进行检测, 否则需弃用。

B. 外周血单个核细胞 (PBMC) 标本

1) 对于使用其它抗凝剂 (如 EDTA 或枸橼酸钠) 抗凝血, 采集静脉血至少 1ml, 采集后 4 小时内使用;

2) 加入等体积的 Hank's 液或不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的 PBS 或生理盐水稀释血液;

3) 取 1ml 淋巴细胞分离液 (Cat# LSM01 或 MLSM1092, 联科生物) 加入离心管中;

4) 将稀释血液小心地加到淋巴细胞分层液上, 注意保持两者界面清晰;

5) 室温下, 1500r/min, 离心 15 分钟;

6) 用毛细吸管轻轻吸出单个核细胞层, 加入含有 4-5ml Hank's 液或不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的 PBS 或生理盐水的试管中, 充分混匀;

7) 1500r/min, 离心 10 分钟, 弃上清后, 再洗一次;

8) 弃上清, 用含 10% 胎牛血清的培养基重悬单个核细胞, 用台酚兰染色计数活细胞数 (应在 95% 以上);

9) 调节细胞浓度为 1×10^7 细胞/ml。





【需要的产品】（以 MultiSciences Th17 检测试剂盒为例）

Human——人 Th17 染色试剂盒/ Human Th17 staining kit

组分	编号	25T	100T
抗人 CD3, FITC (克隆号: OKT3)	AH00301	150 µl	600 µl
抗人 CD8α, PerCP-Cy5.5 (克隆号: RPA-T8)	AH008A07	150 µl	600 µl
抗人 IL-17A, PE (克隆号: (64DEC17))	AH0I1704	150 µl	600 µl
佛波酯/离子霉素混合物 (250×)	CS1001	100 µl	200 µl
布雷非德菌素 A/莫能霉素混合物 (250×)	CS1002	100 µl	200 µl
固定破膜剂试剂 A	GASA	3 ml	11 ml
固定破膜剂试剂 B	GASB	3 ml	11 ml
流式染色缓冲液 (10×)	S1002	15 ml	60 ml

Mouse——小鼠 Th17 染色试剂盒/ Mouse Th17 staining kit

组分	编号	25T	100T
抗小鼠 CD3ε, FITC (克隆号: 145-2C11)	AM003E01	150 µl	600 µl
抗小鼠 CD4, PerCP- Cy5.5 (克隆号: GK1.5)	AM00407	150 µl	600 µl
抗小鼠 IL-17A, PE (克隆号: 17B7)	AM0I1704	150 µl	600 µl
佛波酯/离子霉素混合物 (250×)	CS1001	100 µl	200 µl
布雷非德菌素 A/莫能霉素混合物 (250×)	CS1002	100 µl	200 µl
固定破膜剂试剂 A	GASA	3 ml	11 ml
固定破膜剂试剂 B	GASB	3 ml	11 ml
流式染色缓冲液 (10×)	S1002	15 ml	60 ml

【其他可能需要的产品】

产品名称	编号	规格	供应商
人淋巴细胞分离液	LSM01	200ml	MultiSciences
小鼠淋巴细胞分离液	MLSM1092	200ml	MultiSciences
4% 多聚甲醛	F0001	100ml	MultiSciences
补偿调节微球	01-1111-41	25 tests	Thermo Fisher

【预实验检测刺激效果】

- 1) 全血标本：取 125ul 抗凝血至流式管中，加入 125µl 不含血清的培养基稀释到 250ul；
PBMC 标本：用含 10% 胎牛血清的培养基重悬单个核细胞，用台盼兰染色计数活细胞数





- (应在 95% 以上); 调节细胞浓度为 1×10^7 /ml, 取 250ul;
- 2) 在标本中加入 250 \times PMA/Ionomycin (Multisciences #CS1001) 1ul, 混匀;
 - 3) 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱培养 4~6 小时, 期间注意相隔 1~2 小时混匀一次;
 - 4) 取 100ul 样本, 加入 Human CD3 (或 Mouse CD4) 和 CD69 PE (用量详见说明书), 室温孵育 20 分钟(全血样本溶血)后, 用流式染色缓冲液(Multisciences #S1001)洗一遍, 300g 离心 5 分钟, 弃上清, 用流式染色缓冲液重悬至 500ul, 上机检测;
 - 5) CD3+ (或 CD4+) 细胞中, CD69 的阳性率应达到 90%以上, 进行下一步正式实验。

【正式实验】

- 1a. 全血标本: 取 125 μ l 抗凝血至流式管中, 加入 125 μ l 不含血清的培养基和 1 μ l PMA/Ionomycin Mixture (250 \times) 和 1 μ l BFA/Monensin Mixture (250 \times)。取 125 μ l 抗凝血和 125 μ l 不含血清的培养基, 作为对照。混匀, 37 $^{\circ}$ C孵育 4 - 6 小时, 每隔 1 - 2 小时取出震荡混匀。
- 1b. PBMC 标本: 用含 10% 胎牛血清的培养基重悬单个核细胞, 使细胞浓度为 1×10^7 /ml。取 250 μ l PBMCs 至流式管中, 加入 1 μ l PMA/Ionomycin Mixture (250 \times)和 1 μ l BFA/Monensin Mixture (250 \times)。以只含 PBMCs 的样本作为对照。混匀, 37 $^{\circ}$ C孵育 4 - 6 小时, 每隔 1 - 2 小时取出震荡混匀。

注: PMA/Ionomycin Mixture (250 \times)和 BFA/Monensin Mixture (250 \times)极易挥发, 使用后请及时旋紧管盖。

2. 从样本管和对照管中取 100 μ l 细胞悬液至新的流式管中, 加入 5 μ l Anti-Human CD3, FITC 和 5 μ l Anti-Human CD8 α , PerCP-Cy5.5 (或加入 5 μ l Anti-Mouse CD3 ϵ , FITC 和 5 μ l Anti-Mouse CD4, PerCP-Cy5.5)。震荡混匀, 室温避光孵育 15 分钟。
3. 每管加入 100 μ l FIX & PERM Medium A, 震荡混匀, 室温避光孵育 15 分钟。
4. 用蒸馏水将 10 \times Flow Cytometry Staining Buffer 稀释为 1 \times , 每管加入 2 ml 预冷 1 \times Flow Cytometry Staining Buffer, 300 \times g 离心 5 分钟, 弃上清。

注: 液体尽量倒干净, 不要有残留。

5. 每管加入 100 μ l FIX & PERM Medium B 和 5 μ l Anti-Human IL-17A, PE (或 5 μ l Anti-Mouse IL-17A, PE)。震荡混匀, 室温避光孵育 15 分钟。
6. 每管加入 2 ml 1 \times Flow Cytometry Staining Buffer, 300 \times g 离心 5 分钟, 弃上清。
7. 每管加入 500 μ l 1 \times Flow Cytometry Staining Buffer 重悬, 上机检测; 或者加入 500 μ l 1-4 %多聚甲醛重悬, 2- 8 $^{\circ}$ C避光, 于 24 小时内检测。





【结果示例】

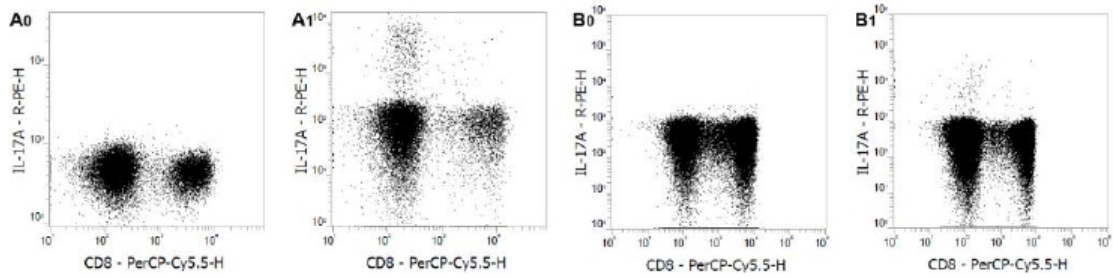


图 1. 使用 Human Th17 Staining Kit 进行流式检测。静息的肝素抗凝血(A0)和 EDTA 抗凝血来源的 PBMCs (B0)染色 IL-17A。PMA/Ionomycin 刺激的肝素抗凝血(A1)和 EDTA 抗凝血来源的 PBMCs (B1)染色 IL-17A。对 CD3+/CD8-细胞进行设门分析。实验在 Thermo Fisher 公司的 Attune NxT 流式细胞仪上进行。志愿者的健康状况未详。

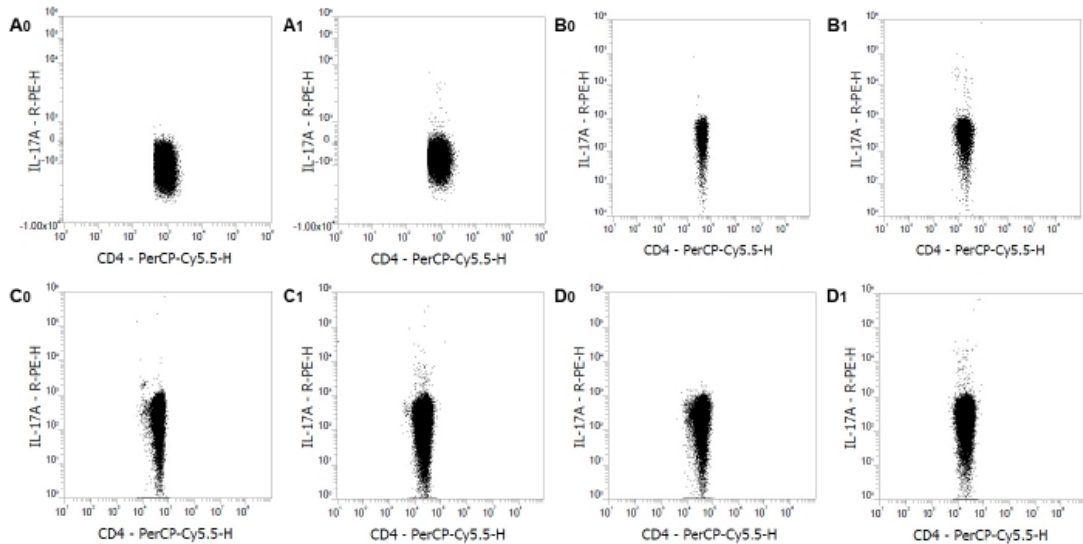


图 2. 使用 Mouse Th17 Staining Kit 进行流式检测。正常 ICR 小鼠的静息肝素抗凝血(A0)、EDTA 抗凝血来源的 PBMCs (B0)、脾细胞(C0)和脾单个核细胞(D0)染色 IL-17A。正常 ICR 小鼠的 PMA/Ionomycin 刺激的肝素抗凝血(A1)、EDTA 抗凝血来源的 PBMC (B1) 脾细胞 (C1)和脾单个核细胞(D1)染色 IL-17A。对 CD3+/CD4+细胞进行设门分析。实验在 Thermo Fisher 公司的 Attune NxT 流式细胞仪上进行。

