



小鼠脾脏 T 细胞和人 PBMCs 的体外 T 细胞活化

导言

成熟 T 细胞通过 TCR 识别并与抗原-MHC 复合物反应。TCR 活化的最直接后果是信号通路的起始，这些信号通路包括诱导特异性蛋白酪氨酸激酶（PTKs）、PIP2 分解、PKC 活化以及细胞内钙离子浓度的升高。这些早期事件被传递到核，产生诸多效应：

- 1) T 细胞克隆的扩增
- 2) 细胞表面活化标志的上调
- 3) 分化成效应性细胞
- 4) 诱导细胞毒或细胞因子的分泌
- 5) 诱导凋亡

最常用的体外刺激检测 T 细胞增殖的方法是用 TCR 的抗原或竞争性抗体活化 T 细胞。本方案是一个基本方法，用 CD3 体外刺激小鼠脾 T 细胞和人类外周血 T 细胞的增殖，关键参数包括细胞密度、抗体滴度和活化动力学。

一、小鼠 T 细胞活化

用包被的 anti-CD3 ϵ (145-2C11) 单抗刺激小鼠 T 细胞；MTT 法测细胞增殖。

实验材料

1X 无菌 PBS

Anti-Mouse CD3 ϵ , Functional Grade (Clone:145-2C11) (MultiSciences, Cat#AM003E)

Anti-Mouse CD28, Functional Grade (Clone:37.51) (MultiSciences, Cat#AM028)

RPMI-1640 完全培养基

无菌的小鼠脾脏或淋巴结单细胞悬液

96 孔平底带盖微孔板 (Corning, Cat#3596)

刀豆蛋白 A (ConA), 可选 (Sigma, Cat#C5275)

MTT 溶液 (MultiSciences, Cat#MTT001, MTT 细胞增殖检测试剂盒组分)

Formazan Solvent (MultiSciences, Cat#MTT001, MTT 细胞增殖检测试剂盒组分)

红细胞裂解液 (MultiSciences, Cat# LYS)





实验时间

- 2 小时包被抗体
- 20 分钟制备脾脏单细胞悬液
- 20 分钟分析设置
- 2-4 天孵育

实验步骤

1. 抗体包被至微孔板：

- 1) 用无菌 PBS 制备 5-10 μ g/ml 的 anti-CD3e(145-2C11)抗体溶液，计算所需的抗体量，每个条件或样本需做复孔。例如，包被半块板（48 孔板）需要 2.6ml 抗体溶液。若用其他抗体共刺激时，CD3 抗体的浓度可以降低。
- 2) 96 孔板中，每孔加入 50 μ l 抗体，空白对照孔加 50 μ l 无菌 PBS。
- 3) 用 Parafilm™ 膜将板封好，37 $^{\circ}$ C 孵育 2 小时或 4 $^{\circ}$ C 过夜。
- 4) 加细胞之前，将孔内的抗体溶液吸去。
- 5) 每孔用 200 μ l 无菌 PBS 洗后，弃去 PBS。
- 6) 重复洗一次，去除所有的未结合抗体。

2. 加细胞：

- 1) 取脾脏，无菌制备单细胞悬液，溶血去除红细胞。
- 2) 计数细胞并重悬 RPMI-1640 完全培养基中，浓度为 10⁶/ml。根据实验需要可选择 2-3 \times 10⁶/ml ~ 10⁵/ml 的浓度。
- 3) 洗板结束后，每孔加 200 μ l 细胞悬液，置于潮湿的 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱中。可选择加刺激对照：ConA 1-4 μ g/ml 刺激后孵育。
- 4) 加入 2-5 μ g/ml anti-CD28 抗体溶液。
- 5) 孵育 2-4 天。可根据具体的实验进行优化。
- 6) 每孔加 20 μ l MTT 溶液，再放回至培养箱中孵育 4 小时。
- 7) 每孔加 50 μ l Formazan Solvent，轻轻振荡并孵育过夜。
- 8) 第二天分光光度计测定 OD₅₇₀ 和参考波长 OD₆₉₀。
- 9) 计算平均值和标准方差，作图。





相关产品

供应商	产品名称	货号	规格
MultiSciences	Anti-Mouse CD3e Monoclonal Antibody, Functional Grade	AM003E	20/50/100µg
MultiSciences	Anti-Mouse CD28 Monoclonal Antibody, Functional Grade	AM028	20/50/100µg
MultiSciences	红细胞裂解液 (不含固定剂) (10×)	LYS	100/250/500T
MultiSciences	MTT 细胞增殖检测试剂盒	MTT001	100T
Corning	96 孔板, 平底, 带盖, TC 表面, 带盖, 灭菌	3596	50 包/箱

二、人 T 细胞活化

用包被的 CD3 单抗刺激人外周血单个核细胞 (PBMCs); MTT 法检测细胞增殖。

实验材料

1X 无菌 PBS

Anti-Human CD3, Functional Grade (Clone:OKT3) (Multiscience, Cat: AH003)

Anti-Human CD28, Functional Grade (Clone:CD28.2) (Multiscience, Cat: AH028)

RPMI-1640 完全培养基

无菌的人 PBMCs

96 孔平底带盖微孔板 (Corning, Cat#3596)

MTT 溶液 (MultiSciences, Cat#MTT001, MTT 细胞增殖检测试剂盒组分)

Formazan Solvent (MultiSciences, Cat#MTT001, MTT 细胞增殖检测试剂盒组分)

实验时间

2-18 小时包被抗体

30 分钟制备人 PBMCs

20 分钟分析设置

2-4 天孵育





实验步骤

1. 抗体包被至微孔板:

- 1) 用无菌 PBS 制备 5-10 μ g/ml 的 anti-CD3(OKT3)抗体溶液, 计算所需的抗体量, 每个条件或样品需做复孔。例如, 包被半块板 (48 孔板) 需要 2.6ml 抗体溶液。若用其他抗体共刺激时, CD3 抗体的浓度可以降低。
- 2) 96 孔板中, 每孔加入 50 μ l 抗体, 空白对照孔加 50 μ l 无菌 PBS。
- 3) 用 Parafilm™ 膜将板封好, 37°C 孵育 2 小时或 4°C 过夜。
- 4) 加细胞之前, 将孔内的抗体溶液吸去。
- 5) 每孔用 200 μ l 无菌 PBS 洗后, 弃去 PBS。
- 6) 重复洗一次, 去除所有的未结合抗体。

2. 加细胞:

- 1) 制备 PBMCs 并重悬于 RPMI 完全培养基中, 浓度为 10⁶/ml。根据实验需要可选择 2-3 \times 10⁶/ml ~ 10⁵/ml 的浓度。
- 2) 洗板结束后, 每孔加 100 μ l 细胞悬液, 每个样本重复做 3 个孔。
- 3) 加入 2-5 μ g/ml anti-CD28 抗体溶液。
- 4) 37°C, CO₂培养箱孵育 2-4 天。可根据具体的实验进行优化。
- 5) 每孔加 20 μ l MTT 溶液, 再放回至培养箱中孵育 4 小时。
- 6) 每孔加 50 μ l Formazan Solvent, 轻轻振荡并孵育过夜。
- 7) 第二天分光光度计测定 OD₅₇₀和参考波长 OD₆₉₀。
- 8) 计算平均值和标准方差, 作图。

相关产品

供应商	产品名称	货号	规格
MultiSciences	Anti-Human CD3 Monoclonal Antibody, Functional Grade	AH003	20/50/100 μ g
MultiSciences	Anti-Human CD28 Monoclonal Antibody, Functional Grade	AH028	20/50/100 μ g
MultiSciences	人淋巴细胞分离液	LSM01	200ml
MultiSciences	MTT 细胞增殖检测试剂盒	MTT001	100T
Corning	96 孔板, 平底, 带盖, TC 表面, 带盖, 灭菌	3596	50 包/箱

