



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 112345747 A

(43)申请公布日 2021.02.09

(21)申请号 201910731332.X

G01N 33/543(2006.01)

(22)申请日 2019.08.08

G01N 33/577(2006.01)

(71)申请人 上海赛比曼生物科技有限公司

地址 201210 上海市浦东新区中国(上海)

自由贸易试验区法拉第路85号3号楼

申请人 无锡赛比曼生物科技有限公司

(72)发明人 陈应炉 戴成祥 刘必佐 王静

李苏克 石颖轩

(74)专利代理机构 上海一平知识产权代理有限

公司 31266

代理人 胡丹 徐迅

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

权利要求书2页 说明书8页 附图1页

(54)发明名称

一种用于检测人间充质干细胞抑制Th17细胞增殖功能的试剂盒

(57)摘要

本发明涉及一种用于检测人间充质干细胞抑制Th17细胞增殖功能的试剂盒。具体地,本发明提供一种MSC免疫调节功能检测试剂盒,所述试剂盒包括:小鼠抗人CD3单克隆抗体、rh IL-1 β 、rh IL-2、rh IL-6、rh IL-23、rh TGF- β 1、小鼠抗人(mouse anti human)IFN- γ 中和抗体、小鼠抗人IL-4中和抗体、小鼠抗人CD3-APC流式抗体、小鼠抗人CD4-FITC流式抗体、小鼠抗人IL-17A-PE流式抗体。本发明试剂盒能体外活化MSC,体外快速诱导Th17细胞,加入活化后的MSC共培养,可以用于人MSC细胞抑制免疫细胞增殖功能的检测。

1. 一种用于检测人间充质干细胞抑制Th17细胞增殖功能的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括:

- (a) 小鼠抗人CD3单克隆抗体;
- (b) rh IL-1 β ;
- (c) rhIL-2;
- (d) rhIL-6;
- (e) rhIL-23;
- (f) rhTGF- β 1;
- (g) 小鼠抗人(mouse anti human) IFN- γ 中和抗体;
- (h) 小鼠抗人IL-4中和抗体;
- (i) 小鼠抗人CD3-APC流式抗体;
- (j) 小鼠抗人CD4-FITC流式抗体;
- (k) 小鼠抗人IL-17A-PE流式抗体。

2. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包括:免疫细胞基础培养基。

3. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包括:干细胞基础培养基。

4. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包括:胰酶。

5. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包括:BD固定破膜剂。

6. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包括:CD4+T细胞分离试剂盒。

7. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括:

- (a) 小鼠抗人CD3单克隆抗体,100ul,1 μ g/mL;
- (b) rh IL-1 β ,100ul,10ug/ml;
- (c) rh IL-2,500ul,100万IU/ml;
- (d) rh IL-6,50ul,20ug/ml;
- (e) rh IL-23,50ul,10ug/ml;
- (f) rh TGF- β 1,50ul,5ng/ul;
- (g) 小鼠抗人IFN- γ 中和抗体,400ul,500ug/ml;
- (h) 小鼠抗人IL-4中和抗体,400ul,500ug/ml;
- (i) 小鼠抗人CD3-APC流式抗体,50ul,0.2mg/ml;
- (j) 小鼠抗人CD4-FITC流式抗体,50ul,0.2mg/ml;
- (k) 小鼠抗人IL-17A-PE流式抗体,50ul,0.25mg/ml。

8. 如权利要求7所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包括:50ml胎牛血清FBS。

9. 如权利要求7所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包括PBS、RPMI-1640培养基、 α -MEM、胰酶、BD固定破膜剂、CD4+T细胞分离试剂盒、淋巴细胞刺激物、小鼠IgG1-FITC同型对照、小鼠IgG1k-APC同型对照、小鼠IgG1k-PE同型对照。

10. 权利要求1-9中任一所述试剂盒的用途,其特征在于,所述试剂盒用于:

- (i) 体外活化MSC;
- (ii) 体外快速诱导Th17细胞;
- (iii) 体外诱导的CD4免疫细胞与MSC共培养;

(iv) 用于检测人MSC细胞抑制免疫细胞增殖。

一种用于检测人间充质干细胞抑制Th17细胞增殖功能的试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测试剂盒,具体地涉及一种用于检测人间充质干细胞抑制Th17细胞增殖功能的试剂盒。

背景技术

[0002] 大量的文献报道间充质干细胞能治疗急性移植物抗宿主病、重症难治性系统性红斑狼疮、多发性硬化症 (MS) 和肌萎缩性侧束硬化症 (ALS) 等多种自身免疫性疾病,间充质干细胞治疗自身免疫性疾病与免疫调节作用有关,2016年,国际细胞治疗协会建议免疫调节功能检测作为间充质干细胞临床试验的放行标准,国际上也有批准MSC治疗自身免疫性疾病多种细胞治疗药物。

[0003] Th17是由TH0细胞在IL-6、IL-23和TGF- β 1等刺激下分化而成的辅助性T细胞,主要分泌IL-17、IL-22等促炎症因子。TH17细胞与许多炎症反应和自身免疫性疾病的发生和发展有关。大量研究表明,IL-17与实验性自身免疫性脑炎 (EAE)、哮喘、类风湿性关节炎 (RA) 等自身免疫性疾病明显相关。

[0004] MSC免疫调节作用的体外实验在MSC质量检测起重要作用,是很多科研和临床研究的基础。但是现有技术中还没有能够相应的、成熟的并适用于MSC免疫调节体外实验研究的试剂盒。

发明内容

[0005] 本发明为了克服现有技术的不足,提供了一种操作简单、快捷的用于检测人间充质干细胞抑制Th17细胞增殖功能的试剂盒。

[0006] 本发明的第一方面,提供了一种用于检测人间充质干细胞抑制Th17细胞增殖功能的试剂盒,所述试剂盒包括:

- [0007] (a) 小鼠抗人CD3单克隆抗体;
- [0008] (b) rh IL-1 β ;Recombinant Human简称rh;
- [0009] (c) rhIL-2;
- [0010] (d) rhIL-6;
- [0011] (e) rhIL-23;
- [0012] (f) rhTGF- β 1;
- [0013] (g) 小鼠抗人(mouse anti human) IFN- γ 中和抗体;
- [0014] (h) 小鼠抗人IL-4中和抗体;
- [0015] (i) 小鼠抗人CD3-APC流式抗体;
- [0016] (j) 小鼠抗人CD4-FITC流式抗体;
- [0017] (k) 小鼠抗人IL-17A-PE流式抗体。
- [0018] 在另一优选例中,所述试剂盒还包括:胎牛血清FBS。

- [0019] 在另一优选例中,所述试剂盒还包括:缓冲溶液。
- [0020] 在另一优选例中,所述缓冲溶液选自下组:PBS、生理盐水。
- [0021] 在另一优选例中,所述试剂盒还包括:免疫细胞基础培养基。
- [0022] 在另一优选例中,所述免疫细胞基础培养基为RPMI-1640培养基。
- [0023] 在另一优选例中,所述试剂盒还包括:干细胞基础培养基。
- [0024] 在另一优选例中,所述干细胞基础培养基为 α -MEM。
- [0025] 在另一优选例中,所述试剂盒还包括:胰酶。
- [0026] 在另一优选例中,所述试剂盒还包括:BD固定破膜剂。
- [0027] 在另一优选例中,所述试剂盒还包括:CD4+T细胞分离试剂盒。
- [0028] 在另一优选例中,所述CD4+T细胞分离试剂盒为stemcell公司成品:EasySepTMHuman CD4+T Cell Isolation Kit。
- [0029] 在另一优选例中,所述试剂盒还包括:淋巴细胞刺激物。
- [0030] 在另一优选例中,所述淋巴细胞刺激物为BD公司成品:Leukocyte Activation Cocktail,with BD GolgiPlugTM。
- [0031] 在另一优选例中,所述试剂盒还包括:小鼠IgG1-FITC同型对照。
- [0032] 在另一优选例中,所述试剂盒还包括:小鼠IgG1k-APC同型对照。
- [0033] 在另一优选例中,所述试剂盒还包括:小鼠IgG1k-PE同型对照。
- [0034] 在另一优选例中,所述试剂盒为N人份,N=3-50。
- [0035] 在另一优选例中,所述试剂盒为10人份(10test)。
- [0036] 在另一优选例中,所述试剂盒还包括PBS、RPMI-1640培养基、 α -MEM、胰酶、BD固定破膜剂、CD4+T细胞分离试剂盒、淋巴细胞刺激物、小鼠IgG1-FITC同型对照、小鼠IgG1k-APC同型对照、小鼠IgG1k-PE同型对照。
- [0037] 在另一优选例中,所述试剂盒还包括破膜液(Permeabilization Solution)和/或固定液(Fixation Solution)。
- [0038] 在另一优选例中,所述破膜液(破膜剂)来自于BD产品Fixation/Permeabilization Solution Kit。
- [0039] 在另一优选例中,所述固定液(固定剂)来自于BD产品Fixation/Permeabilization Solution Kit。
- [0040] 在另一优选例中,所述试剂盒包括:
- [0041] (a) 小鼠抗人CD3单克隆抗体,100ul,1 μ g/mL;
- [0042] (b) rh IL-1 β ,100ul,10ug/ml;
- [0043] (c) rh IL-2,500ul,100万IU/ml;
- [0044] (d) rh IL-6,50ul,20ug/ml;
- [0045] (e) rh IL-23,50ul,10ug/ml;
- [0046] (f) rh TGF- β 1,50ul,5ng/ul;
- [0047] (g) 小鼠抗人IFN- γ 中和抗体,400ul,500ug/ml;
- [0048] (h) 小鼠抗人IL-4中和抗体,400ul,500ug/ml;
- [0049] (i) 小鼠抗人CD3-APC流式抗体,50ul,0.2mg/ml;
- [0050] (j) 小鼠抗人CD4-FITC流式抗体,50ul,0.2mg/ml;

[0051] (k) 小鼠抗人IL-17A-PE流式抗体,50ul,0.25mg/ml。

[0052] 在另一优选例中,所述试剂盒还包括:50ml胎牛血清FBS。

[0053] 在另一优选例中,所述试剂盒还包括PBS、RPMI-1640培养基、 α -MEM、胰酶、BD固定破膜剂、CD4+T细胞分离试剂盒、淋巴细胞刺激物、小鼠lgG1-FITC同型对照、小鼠lgG1k-APC同型对照、小鼠lgG1k-PE同型对照。

[0054] 本发明的第二方面,提供了本发明的第一方面所述试剂盒的用途,所述试剂盒用于:

[0055] (i) 体外活化MSC;

[0056] (ii) 体外快速诱导Th17细胞;

[0057] (iii) 体外诱导的CD4免疫细胞与MSC共培养;

[0058] (iv) 用于检测人MSC细胞抑制免疫细胞增殖。

[0059] 应理解,在本发明范围内中,本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合,从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅,在此不再一一累述。

附图说明

[0060] 图1是两个对照:上方两个图是空白对照,空白对照用的是没染色的CD4细胞,上方左图说明没有染CD4-FITC,所以就没有荧光,数据是零,上方右图说明没有染IL-17A-PE,所以就没有荧光,数据是零。

[0061] 下面两个图是同型对照,同型对照用的是同型对照抗体染色,数据是零,说明都没有非特异性抗体,主要测抗体的特异性。

[0062] 两个对照说明这个抗体是特异性的,无其他影响,数据是真实的。

[0063] 图2上方两个图是阴性对照,上方左图是CD4细胞,基本100%,说明本发明的分离步骤得到的都是CD4细胞,上方右图是诱导Th17分泌的IL-17是成功的,达到了1.7%。

[0064] 下方两个图是本发明测试的实验组,同样是CD4分离,得到几乎100%CD4细胞,诱导刺激也是相同方法,唯一不同是这组加了MSC细胞,再去测试Th17的IL-17分泌,结果是0.7%。

[0065] 整个图2的四张图说明了MSC能抑制Th17的IL-17分泌,从而间接证明MSC免疫调节功能。

具体实施方式

[0066] 本发明通过广泛而深入的研究,首次意外地开发了一种试剂盒,所述试剂盒包括:CD3单克隆抗体;IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-23、TGF- β 1、IFN- γ 中和抗体、IL-4中和抗体、小鼠抗人CD3-APC流式抗体、小鼠抗人CD4-FITC流式抗体、IL-17A-PE流式抗体。本发明试剂盒可用于用于MSC免疫调节作用的体外实验。能体外活化MSC,体外快速诱导Th17细胞,加入MSC共培养,可以用于检测人间充质干细胞抑制Th17细胞增殖功能。在此基础上完成了本发明。

[0067] 术语

[0068] MSC

[0069] MSC是Mesenchymal Stem Cell缩写,即间充质干细胞,是干细胞的一种,是来源于

中胚层的一类非造血系统多能干细胞,可以分化为神经、心脏、肝脏、骨、软骨、肌腱、脂肪、上皮等多种细胞。间充质干细胞广泛分布于胎儿和成体的骨髓、骨膜、松骨质、脂肪、滑膜、骨骼肌、胎肝、乳牙、脐带、脐带血中。现已证实MSC具有很强的抗炎和抑制多种免疫细胞的能力。

[0070] 体外活化MSC

[0071] MSC免疫抑制功能的发挥需要被预先激活,有实验证明,一些免疫细胞分泌的前炎症细胞因子,如 $\text{INF-}\gamma$ 、 $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 等细胞因子可以激活MSC,使MSC发挥免疫抑制作用。

[0072] 体外快速诱导Th17细胞

[0073] 辅助性T细胞17(T helper cell 17,Th17)是一种新发现的能够分泌白介素17(interleukin 17,IL-17)的T细胞亚群,在自身免疫性疾病和机体防御反应中具有重要的意义。初始CD4⁺T细胞接受抗原刺激后,在不同的条件下可分化成不同亚型的T细胞,执行不同的功能,在 $\text{TGF-}\beta$ 和IL-6的共同诱导下分化为Th17,分泌IL-6和IL-17,参与炎症反应和自身免疫性疾病。

[0074] 人MSC细胞免疫细胞抑制功能的检测

[0075] MSC的免疫调节功能,体外需要与免疫细胞共培养才能体现,本案例中,诱导后的Th17细胞IL-17表达量会增加,加入MSC后,MSC会影响Th17细胞IL-17表达,表达量会降低,所以通过流式检测IL-17表达量,即可反应MSC细胞对免疫细胞Th17增殖功能抑制的检测。即反应了MSC免疫调节功能。

[0076] 用于检测人间充质干细胞抑制Th17细胞增殖功能的试剂盒

[0077] 本发明提供一种用于检测人间充质干细胞抑制Th17细胞增殖功能的试剂盒。

[0078] 典型地,本发明的用于检测人间充质干细胞抑制Th17细胞增殖功能的试剂盒:

[0079] (a) 小鼠抗人CD3单克隆抗体;

[0080] (b) rh IL-1 β ;Recombinant Human简称rh;

[0081] (c) rh IL-2;

[0082] (d) rh IL-6;

[0083] (e) rh IL-23;

[0084] (f) rh $\text{TGF-}\beta$ 1;

[0085] (g) 小鼠抗人 $\text{INF-}\gamma$ 中和抗体;

[0086] (h) 小鼠抗人IL-4中和抗体;

[0087] (i) 小鼠抗人CD3-APC流式抗体;

[0088] (j) 小鼠抗人CD4-FITC流式抗体;

[0089] (k) 小鼠抗人IL-17A-PE流式抗体。

[0090] 在本发明的一个优选例中,所述试剂盒还包括PBS、RPMI-1640培养基、 α -MEM、胰酶、BD固定破膜剂、CD4⁺T细胞分离试剂盒、淋巴细胞刺激物、小鼠IgG1-FITC同型对照、小鼠IgG1k-APC同型对照、小鼠IgG1k-PE同型对照。

[0091] 试剂盒的用途

[0092] 本发明提供了用于检测人间充质干细胞抑制Th17细胞增殖功能的试剂盒的用途。

[0093] 典型地,本发明试剂盒可用于:

- [0094] (i) 体外活化MSC;
- [0095] (ii) 体外快速诱导Th17细胞;
- [0096] (iii) 免疫细胞(如体外诱导的CD4免疫细胞)与MSC共培养;
- [0097] (iv) 人MSC细胞免疫细胞抑制功能的检测。
- [0098] 在另一优选例中,本发明试剂盒可用于MSC活化。
- [0099] 在另一优选例中,本发明试剂盒可用于Th17的诱导分化。
- [0100] 在另一优选例中,本发明试剂盒可用于细胞内因子(如Th17)染色。
- [0101] 在另一优选例中,本发明试剂盒可用于细胞内因子(如Th17)染色的前端处理。
- [0102] 在另一优选例中,所述细胞因子内染色包括破膜步骤、固定步骤、和细胞因子内染色步骤。
- [0103] 典型地,本发明提供一种MSC活化的方法,所述方法使用本发明的用于检测人间充质干细胞抑制Th17细胞增殖功能的试剂盒。
- [0104] 典型地,本发明提供一种Th17快速诱导方法,所述方法使用本发明的用于检测人间充质干细胞抑制Th17细胞增殖功能的试剂盒。
- [0105] 典型地,本发明提供一种活化的MSC和Th17共培养后,MSC能抑制Th17增殖检测的方法,所述方法包含破膜、固定和胞内染色。
- [0106] 典型地,本发明提供一种活化的MSC和Th17共培养后,MSC能抑制Th17增殖检测的方法,所述方法使用本发明的用于检测人间充质干细胞抑制Th17细胞增殖功能的试剂盒。
- [0107] 典型地,本发明试剂盒可用于MSC活化,Th17快速诱导,活化的MSC和Th17共培养,IL-17A细胞因子检测(细胞因子内染色:包含破膜、固定和流式染色)。
- [0108] 本发明的主要优点在于:
- [0109] (1) 本发明试剂盒集MSC活化,CD4+T细胞分离,Th17快速诱导,胞内因子检测于一体,快速稳定高效,不需要再去摸索实验条件方法。
- [0110] (2) 本发明试剂盒配制已经配好固定浓度,直接使用即可,填补了国内MSC免疫调节功能检测试剂盒的空白。
- [0111] (3) 本发明提供一种新颖的测试试剂盒,不仅优化了检测流程,并且多次实验结果可靠,不同批次检测结果稳定。
- [0112] 下面的具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,例如(Sambrook和Russell等人,分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning-A Laboratory Manual)(第三版)(2001)CSHL出版社)中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明,否则百分比和份数按重量计算。除非另外说明,否则百分比和份数按重量计算。以下实施例中所用的实验材料和试剂如无特别说明均可从市售渠道获得。
- [0113] 实施例1制备本发明的试剂盒
- [0114] 本试剂盒组份包含试剂是:(10test)
- [0115] 胎牛血清FBS---50ml thermo公司货号:10099141;
- [0116] 小鼠抗人CD3单克隆抗体---100ul thermo公司货号:16003781;
- [0117] rhIL-1 β ---100ul Peprotech公司货号:200-01B;
- [0118] rhIL-2---500ul Peprotech公司货号:200-02;

- [0119] rhIL-6---50ul Peprotech公司货号:200-06;
- [0120] rhIL-23---50ul Peprotech公司货号:200-23;
- [0121] rhTGF- β 1---50ul Peprotech公司货号:100-21C;
- [0122] 小鼠抗人(mouse anti human) IFN- γ 中和抗体---400ul 500-M90-500;
- [0123] 小鼠抗人IL-4中和抗体---400ul Peprotech公司货号:500-M04-500;
- [0124] 小鼠抗人CD3-APC流式抗体---50ul Biolegend公司货号:100235;
- [0125] 小鼠抗人CD4-FITC流式抗体---50ul Biolegend公司货号:357405;
- [0126] 小鼠抗人IL-17A-PE流式抗体---50ul Biolegend公司货号:512306。
- [0127] 除了本试剂盒所用试剂以外:涉及到的试剂还有PBS (thermo公司货号:20012027)、RPMI-1640培养基(thermo公司货号:11875093)、 α -MEM(thermo公司货号:C12571500BT)、胰酶(thermo公司货号:25200056)、BD固定破膜剂(BD公司货号:554714)、CD4+T细胞分离试剂盒(stemcell公司货号:17952)、淋巴细胞刺激物(BD公司货号:550583)、小鼠IgG1-FITC isotype control (Biolegend同型对照)(公司货号:400109)、小鼠IgG1k-APC isotype control (同型对照)(Biolegend公司货号:400122)、小鼠IgG1k-PE isotype control (同型对照)(Biolegend公司货号:400113)等。
- [0128] 实施例2试剂盒的应用
- [0129] 1.间充质干细胞样本准备
- [0130] 1.1复苏待检测间充质干细胞,按照5000个/cm²接种于10cm培养皿中,注意观察细胞状态,接种后第三天(此时细胞融合度应大于50%),给细胞更换新鲜培养基,并向培养基中加入IL-1 β (1ng/ul):10ul(终浓度10ng/mL),再培养一天。
- [0131] 2.PBMC中CD4+T细胞的分选及刺激培养
- [0132] 2.1.CD4+T细胞分选前一天,用1 μ g/mL CD3单克隆抗体包被24孔板,4℃过夜备用,本次实验共需4个孔,各孔名称如下:
- [0133] 孔1:空白对照孔,无需CD3包被;
- [0134] 孔2:Th17对照孔(不加MSCs),需CD3包被;
- [0135] 孔3:Th17样本孔(加MSCs),需CD3包被;
- [0136] 孔4:Th17同型对照孔,需CD3包被;
- [0137] 从PBMC中分选CD4+T细胞(参照CD4+T分离试剂盒说明书)
- [0138] 2.2.取1支PBMC(5×10^7 个/支),37℃水浴锅中迅速解冻,然后转移至加有5ml RPMI1640完全培养基中,300g离心5min,弃上清,将收集到的PBMC按照 5×10^7 个/ml的浓度重悬于0.5ml—2mlRPMI1640完全培养基中;
- [0139] 2.3.将上述PBMC转移到5ml流式管中,然后按照50ul/ml加入分离试剂,混匀后室温孵育5min;
- [0140] 2.4.涡旋振荡器重悬磁珠30秒;
- [0141] 2.5.按照50ul/ml加入磁珠,用枪头反复吹打混匀后将流式管放入磁力架中,取下流式管盖,室温孵育5min;
- [0142] 2.6.孵育结束后将流式管中液体转移至新的流式管中,从磁力架中取下旧的流式管,然后放入新流式管,室温孵育5min;
- [0143] 2.7.孵育结束后,从流式管中吸出液体,离心收集细胞,收集到的细胞即为所分选

的CD4+T细胞；

[0144] 2.8.将收集到的细胞重悬于1ml RPMI1640完全培养基中并计数。

[0145] CD4+T细胞刺激培养

[0146] 2.9.向上述孔1—孔4中分别加入 1×10^6 个CD4+T细胞并加入1ml RPMI1640完全培养基,其中除孔1无需加任何刺激外,孔2—孔4按下表1加入细胞刺激因子:

[0147] 表1

[0148]

细胞刺激因子名称	原始浓度	1ml 培养基加入量	终浓度
IL-6	20ug/ml	2.5ul	50ng/ml
IL-23	10ug/ml	1ul	10ng/ml
TGF- β 1	5ng/ul	2ul	10ng/ml
INF- γ 中和抗体	500ug/ml	20ul	10ug/ml
IL-4 中和抗体	500ug/ml	20ul	10ug/ml

[0149] 加入细胞刺激因子后,用枪头轻轻混匀,放入37℃二氧化碳培养箱中培养48小时。

[0150] 3.CD4+T细胞与MSCs共培养

[0151] 3.1.将IL-1 β 激活的MSCs胰酶消化下来,并计数;

[0152] 3.2.将IL-1 β 激活的MSC与培养两天的CD4+T细胞按1:10比例共培养(MSC:1 $\times$ 10⁵Cells/well),其中孔1(空白对照孔)、孔2(Th17阳性对照孔)中不加MSCs,其余各孔均加MSCs。

[0153] 3.3.加入MSCs后用枪头轻轻混匀,放入37℃二氧化碳培养箱中培养24h。

[0154] 4.流式检测

[0155] 4.1.MSCs与CD4+T细胞共培养24h后,每孔加入1ul淋巴细胞刺激物(以每孔1ml培养基为例),用枪头轻轻混匀后,放入37℃二氧化碳培养箱中培养4-6h;

[0156] 4.2.刺激培养结束后,收集细胞至1.5ml EP管,各管名称对应上述各孔名称,标记清楚,300g,离心5min,去上清;

[0157] 4.3.每管加入1ml PBS,吹打混匀,300g,离心5min,去上清;

[0158] 4.4.固定破膜:向上述各管中加入250ul的BD固定破膜剂,4℃,孵育20min。孵育结束后,用1 $\times$ 洗涤缓冲液(Wash buffer)洗两遍。

[0159] (注:试剂盒中的洗涤缓冲液(Wash buffer)原浓度为10 $\times$,用前需用超纯水1:10稀释至1 $\times$ 后方可使用);

[0160] 4.5.清洗离心后加PBS 100ul重悬细胞,除管1不加任何抗体外,管2、管3各加入CD3-APC、CD4-FITC、IL-17A-PE各5ul,管4加入APC-Isotype、FITC-Isotype、PE-Isotype各5ul,用枪头轻轻混匀后,室温避光孵育30min。

[0161] 4.6.孵育结束后,每管加入1ml 1 $\times$ 洗涤缓冲液(Wash buffer),300g,离心5min,去上清。

[0162] 4.7.用350ul预冷的PBS重悬细胞并转移到流式管中准备上样,收集数据。

[0163] 5.结果

[0164] 利用此试剂盒,CD4+T增殖明显,细胞状态良好明显集落形成,成功诱导Th17细胞,IL-17A表达量为1.7%,加入MSC细胞能后能大幅度降低IL-17A的表达量至0.7%。具体结果

见图1和图2。

[0165] 图1、图2中,U180607002是MSC样本其中的一个编号。图1中,2个对照,空白对照和同型对照,主要证明没有干扰。图2中,一个加MSC,一个不加MSC。加了MSC后Th17分泌的-IL-17A细胞因子增殖抑制明显。

[0166] 结果表明:本发明试剂盒,能有效完成从MSC活化、CD4+T扩增、Th17细胞诱导和Th17细胞分泌因子IL-17流式检测等MSC免疫抑制体外实验整个流程,方法简便高效。

[0167] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

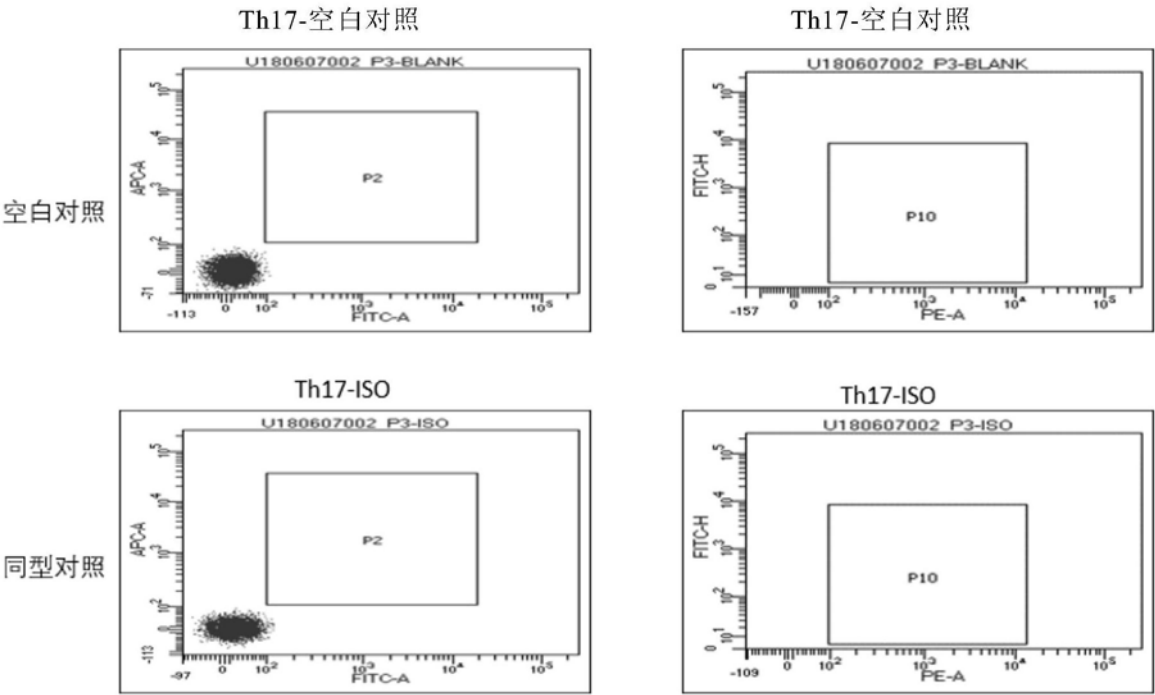


图1

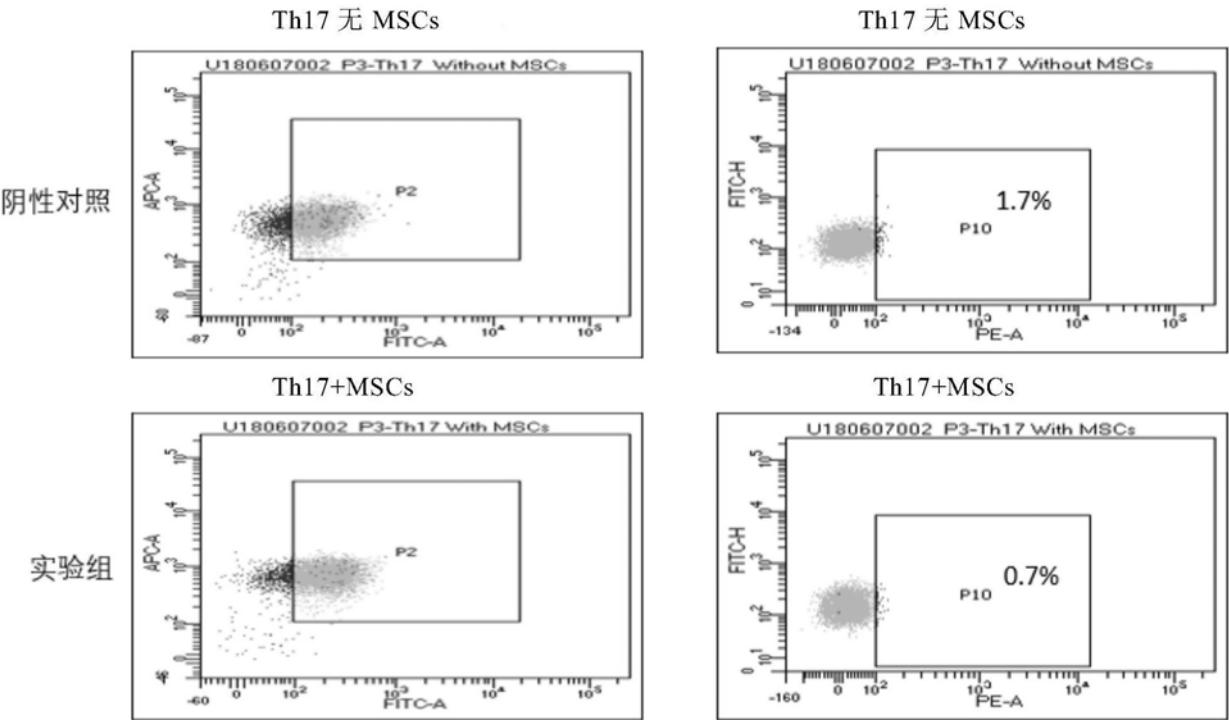


图2