

# 小鼠Th亚群分化方案

## 准备培养基

---

1640培养基、血清(胎牛)、双抗、L-谷氨酰胺、 $\beta$ -巯基乙醇

## 培养基配置

---

RPMI-1640+10%胎牛血清+1mM L-谷氨酰胺+55 $\mu$ M  $\beta$ -巯基乙醇+双抗

## 准备细胞

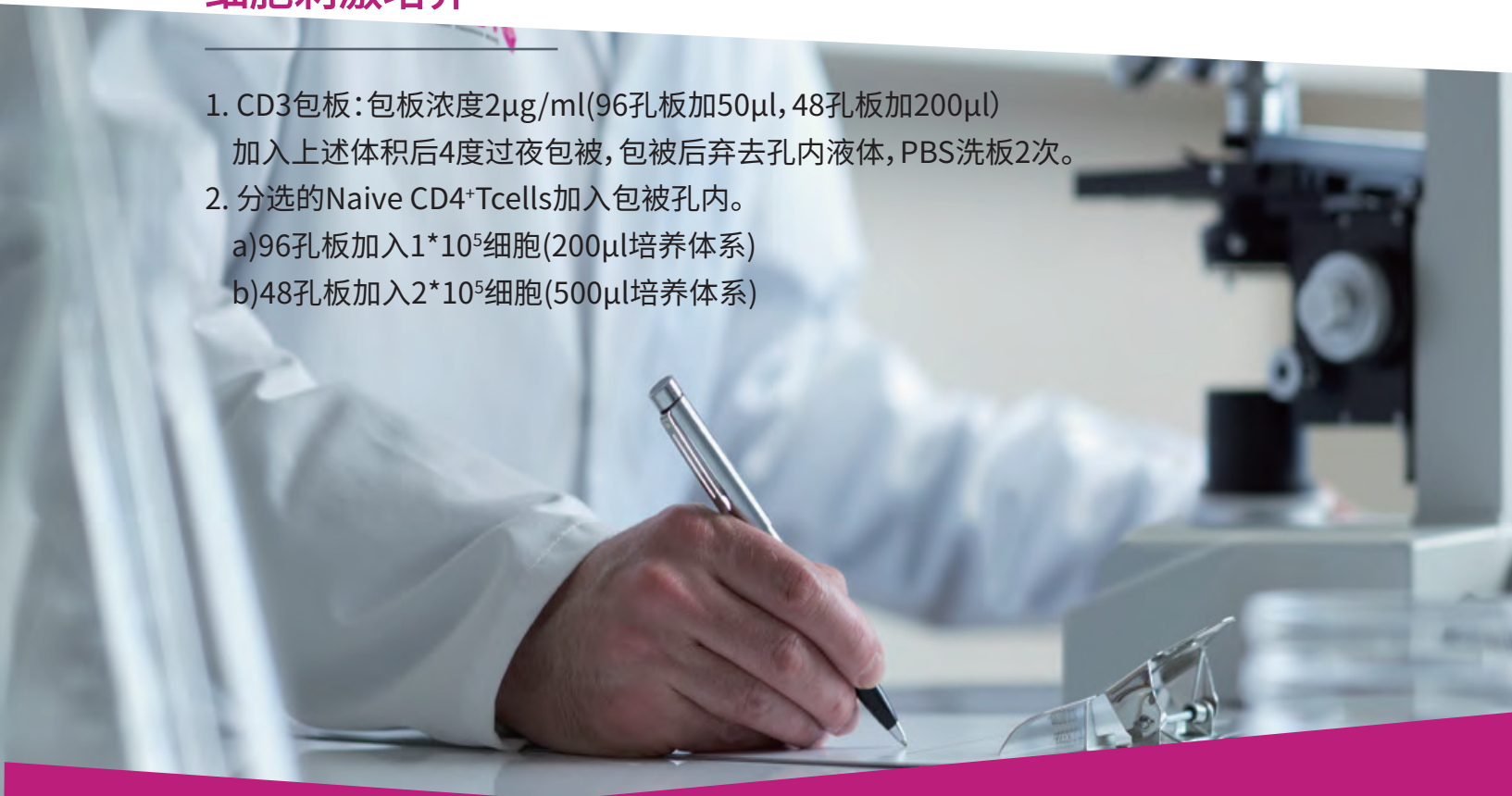
---

分选出Naive CD4<sup>+</sup>T cells(CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD44<sup>low</sup>CD62L<sup>high</sup>)

## 细胞刺激培养

---

1. CD3包板:包板浓度2 $\mu$ g/ml(96孔板加50 $\mu$ l, 48孔板加200 $\mu$ l)  
加入上述体积后4度过夜包被,包被后弃去孔内液体, PBS洗板2次。
2. 分选的Naive CD4<sup>+</sup>T cells加入包被孔内。
  - a)96孔板加入1\*10<sup>5</sup>细胞(200 $\mu$ l培养体系)
  - b)48孔板加入2\*10<sup>5</sup>细胞(500 $\mu$ l培养体系)



### 3. 配置分化培养基(1 $\mu$ g/ml anti-mouse CD28)

按需要分化的方向加入以下分化条件的培养基:

- a) Th0: no cytokines/antibodies +20 ng/ml IL-2
- b) Th1:20 ng/ml IL-12+20 ng/ml IL-2;plus 10 $\mu$ g/mL anti-mouse IL-4;
- c) Th2:10 ng/ml IL-4+20 ng/ml IL-2;plus 10  $\mu$ g/ml anti-mouse IF $\gamma$ ;
- d) Th17:5ng/ml TGF- $\beta$ , 20 ng/ml IL-6,10ng/ml IL-23; plus 10 $\mu$ g/ml anti-mouse IFN $\gamma$ .10 pg/ml anti-mouse IL-4;
- e) Tfh:20 ng/ml IL-6,20 ng/IL-21; plus 10  $\mu$ g/ml anti-mouse IFN $\gamma$ ,10  $\mu$ g/ml anti-mouse IL-4 & 10pg/ml anti-mouse TGF $\beta$ ;
- f) Treg: 20 ng/ml IL2+5ng/ml TGF- $\beta$ .

- 4. 细胞培养分化3-5天,培养过程中若培养液上清变黄,更换培养基,一般建议半量换液,根据培养经验,一般是隔天换液。
- 5. 培养分化后鉴定(胞内染色):分化后的细胞加入20ng/ml PMA, 1 $\mu$ g/ml Ionomycin刺激30min后,加入10 $\mu$ g/ml BFA阻断,继续培养3.5h后收集细胞进行流式检测。
- 6. 细胞鉴定:购买相应的流式抗体及辅助试剂进行胞内染色鉴定。

#### 细胞分化所需细胞因子及抗体:

生产商	产品编号	产品名称	产品规格
PeproTech	212-12	Recombinant Murine IL-2	5 $\mu$ g/20 $\mu$ g/50 $\mu$ g/100 $\mu$ g/250 $\mu$ g/500 $\mu$ g/1000 $\mu$ g
PeproTech	214-14	Recombinant Murine IL-4	5 $\mu$ g/20 $\mu$ g/50 $\mu$ g/100 $\mu$ g/250 $\mu$ g/500 $\mu$ g/1000 $\mu$ g
PeproTech	216-16	Recombinant Murine IL-6	2 $\mu$ g/10 $\mu$ g/50 $\mu$ g/100 $\mu$ g/250 $\mu$ g/500 $\mu$ g/1000 $\mu$ g
PeproTech	210-12	Recombinant Murine IL-12	2 $\mu$ g/10 $\mu$ g/50 $\mu$ g/100 $\mu$ g/250 $\mu$ g/500 $\mu$ g/1000 $\mu$ g
PeproTech	210-21	Recombinant Murine IL-21	2 $\mu$ g/10 $\mu$ g/50 $\mu$ g/100 $\mu$ g/250 $\mu$ g/500 $\mu$ g/1000 $\mu$ g
PeproTech	210-23	Recombinant Murine IL-23	2 $\mu$ g/10 $\mu$ g/50 $\mu$ g/100 $\mu$ g/250 $\mu$ g/500 $\mu$ g/1000 $\mu$ g
PeproTech	100-21	Human TGF-beta1-Mammalian	2 $\mu$ g/10 $\mu$ g/50 $\mu$ g/100 $\mu$ g/250 $\mu$ g/500 $\mu$ g/1000 $\mu$ g
BioGems	05112-25	Anti-Mouse CD3 SAFIRE Purified	100 $\mu$ g/500 $\mu$ g
BioGems	10312-25	Anti-Mouse CD28 SAFIRE Purified	100 $\mu$ g/500 $\mu$ g
Biogems	80812-25	Anti-Mouse IFN gamma SAFIRE Purified	100 $\mu$ g/500 $\mu$ g
BioGems	81112-25	Anti-Mouse IL-4 SAFIRE Purified	100 $\mu$ g/500 $\mu$ g