

2025.7.1

分选 CD8 T Cell

操作:

取组织：断颈处死小鼠，整体浸入含酒精的烧杯中灭菌 3-5min，沿着腹部中线剪开取出脾脏，放入含 PBS 的 6 孔板中，转移至细胞房。

研磨：换用新的 6 孔板或者 50ml 管子(容纳筛网 0.45)，先加 3 mL 的 2%FBS-PBS，放入筛网和脾脏，用针筒芯研磨至无明显固体，转入灭菌 EP 管。离心 2k rpm 3-5min，弃去上清，加入 5ml 红细胞裂解液，吹打混匀，冰上裂解 5min，离心 2k rpm 3-5min，弃去上清。若仍有红色细胞沉积，可多次裂解离心。加入 2%FBS-PBS 重悬。

分选：取 20ul 至细胞计数板，进行计数（单位是个/mL）。根据细胞总数及分选试剂盒的要求比例加入分选试剂。分离得到目标细胞。

铺板：取 20ul 至细胞计数板，进行计数。离心弃去上清，用一定比例的 CFSE 溶液重悬 cell，静置 2 min，加入 PBS 终止染色，离心，去上清。按照铺板密度为 $1-2 \times 10^6$ cell/孔(6 孔板)加入含抗体培养基（刺激增长），显微镜观察确认 cell。

Note:

1、在进行细胞分选前后，均移取部分细胞悬液，加入 CD8+抗体，用于后续流式测定 T cell 的占比，用作试剂盒分选效率的考察；在加入 CFSE 溶液前后，均移取部分 cell 悬液，用于后续流式测定 cell CFSE 信号，用作 cell 传代的阴性和阳性对照。

2、处理过程 cell 低温保存（无培养基，低温降低 cell 代谢）加入 2%FBS-PBS

Tips:

生物安全柜：关紫外、开灯开通风、酒精棉球擦台面

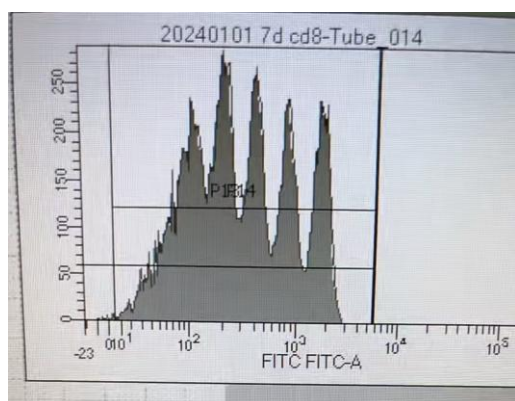
细胞房：物品从传递窗进入，实验人员需佩戴口罩、头套、手套、洁净服、换鞋，各耗材放进通风柜前需喷洒酒精。

设备灭菌：实验服、EP 管（不锈钢盒中）等耗材通过高压灭菌

原理：

1. 荧光染料 CFSE or CFDA SE: 5, 6- carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester, 即羧基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺脂, 是一种可穿透细胞膜的荧光染料, 具有与细胞特异性结合的琥珀酰亚胺脂基团和具有非酶促水解作用的羧基荧光素二醋酸盐基团, 这使得 CFSE 成为一种良好的细胞标记物。当 CFSE 以含有两个乙酸基团和一个 succinimidyl ester 功能基团的形式存在时, 不具有荧光性质, 而具有细胞膜通透性, 能够自由进入细胞; 而当其扩散进入细胞内环境, 内源的酯酶可将其乙酸基团水解, 此种形式的 CFSE 分子具有很高的荧光活性, 被激发能够产生绿色荧光, 却不再具有膜通透性; 同时, 其含有的 succinimidyl ester 基团能与胞内的细胞骨架蛋白中的游离胺基反应, 最终形成具有荧光的蛋白加合物。因此, 当细胞进行分裂增殖时, 具有荧光的胞质蛋白被平均分配到第二代细胞中, 这样与第一代细胞相比, 其荧光强度便会减弱至一半; 以此类推, 分裂得到的第三代细胞的荧光强度便会比第二代细胞再次减弱。这种现象可以在 488nm 的激发光下, 采用流式细胞仪检测分析, 通过检测到细胞荧光强度不断的降低, 进一步分析得出细胞分裂增殖的情况。

传代结果例图：



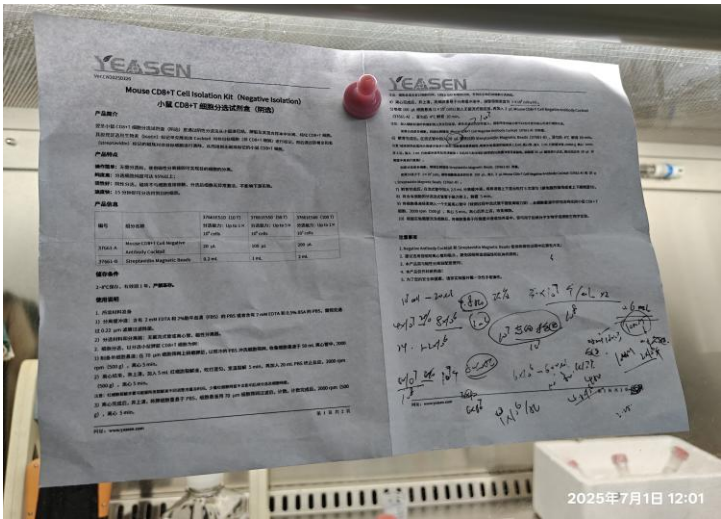
2. 红细胞裂解液 Red Blood Cell Lysis Buffer, 或称 ACK Lysis Buffer: 它既不损伤有核细胞又能充分的去除红细胞。比较温和, 主要用于经酶消化分散的组织细胞的分离纯化, 淋巴细胞的分离纯化以及组织细胞蛋白与核酸提取等实验中红细胞的去除。利用细胞内外的离子浓度差异, 形成渗透压差, 外部的水分会扩散至细胞内, 使红细胞膨胀, 达到裂

解的效果。

ACK lysis buffer		
Reagent	Quantity (for 1000 mL)	Final concentration
NH ₄ Cl	8.02 g	150 mm
KHCO ₃	1 g	10 mm
Na ₂ EDTA	37.2 mg	0.1 mm
Dissolve all reagents in 850 mL of H ₂ O. Adjust the pH to 7.2–7.4, and add H ₂ O to 1000 mL. Store for up to 6 mo at room temperature. [1]		

3. 小鼠 CD8+T 细胞分选试剂盒（阴选）：通过阴性分选法从小淋巴结、脾脏及其混合样本中分离、纯化 CD8+T 细胞。其原理是选用生物素(biotin)标记单克隆抗体 Cocktail 对非目标细胞(非 CD8+T 细胞)进行标记，而后通过链霉亲和素(streptavidin)标记的磁珠对非目标细胞进行清除,从而得到无磁珠标记的小鼠 CD8+T 细胞。

试剂盒说明书：



4. 胎牛血清(FBS)作为临时培养基：是细胞培养环节中常用的营养补充剂。含有大量的细胞生长因子、生长激素、蛋白质别的养分的混合物质，这都是细胞生长和生存所必须的。
- ①胎牛血清是细胞的重要营养来源；②胎牛血清帮助细胞附着和扩散（许多细胞需要附着在基质上才能生长和分裂。胎牛血清含有纤维连接蛋白和层粘连蛋白等蛋白质，通过与细胞表面受体相互作用促进细胞附着和扩散。这些蛋白质为细胞粘附创造了有利的环境，并为细胞生长和扩张提供了锚定点。）③胎牛血清可以起缓冲和 pH 调节作用；④胎牛血清从多方面维持细胞健康（胎牛血清含有延缓细胞凋亡、有助于细胞存活的因素。这些生物活性物质，可以在一定程度上，减少细胞培养过程中，细胞死亡事件的发生，并为维持细胞活力提供有利帮助。）

