流式检测 CD4⁺ T 细胞亚型转录因子

Analyzing Transcription Factors of CD4⁺ T Cell Subtypes by Flow Cytometry

李民, 杨选明*

生命科学技术学院, 上海交通大学, 闵行, 上海

*通讯作者邮箱:xuanmingyang@sjtu.edu.cn

引用格式: 李民, 杨选明. (2019). 流式检测 CD4⁺ T 细胞亚型转录因子. *Bio-101* e1010315. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010315.

How to cite: Li, M. and Yang, X. M. (2019). Analyzing Transcription Factors of CD4⁺ T Cell Subtypes by Flow Cytometry. *Bio-101* e1010315. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010315. (in Chinese)

摘要: Naïve CD4⁺ T 细胞在不同的条件下可诱导形成不同的 CD4⁺ T 细胞亚型, 比如, Th1 (Szabo 等, 2002), Th2 (Mowen 和 Glimcher, 2004; Flaherty 和 Reynolds, 2015), Treg (Sekiya 和 Yoshimura, 2016; Read 等, 2019), Th9 (Kaplan 等 2015), Th17 (Chung 等, 2009; Rumble 和 Segal, 2014)。不同 CD4⁺ T 细胞亚型表达特异的转录因子, 具有不同的免疫学功能, 特异转录因子表达是鉴定不同 CD4⁺ T 细胞亚群的关键指标。本实验以检测转录因子 FoxP3⁺的 CD4⁺ T 细胞分析调节性 T 细胞 Treg 细胞比例为例, 演示体外分化后 CD4⁺ T 细胞亚型转录因子的流式检测。

关键词: T 细胞分化, CD4⁺ T 细胞亚型, Cytokines, 转录因子

材料与试剂

1. 96 孔板 U 型板 (Jet Biofil, catalog number: TCP001096)
2. Anti-mCD4 FITC 抗体 (BioLegend, catalog number: 100405)
3. Anti-FoxP3 抗体 (Thermo Fisher, eBioscience, catalog number: MA5-16224)
4. 2.4G2 (anti-CD16/32 抗体) (BioLegend, catalog number: 101301)
5. 阻断抗体和细胞因子

anti-mouse CD3	BioLegend	100302	克隆号 145-2C11
anti-mouse CD28	BioLegend	102102	克隆号 37.51
anti-mouse IL4	BioLegend	504102	克隆号 11B11

anti-mouse IL12	义翘神州	CT022-RP01	
anti-mouse IL2	BioLegend	503702	克隆号 JES6-1A12
anti-mouse IFN γ	BioLegend	505802	克隆号 XMG1.2
mouse IL2	BioLegend	575406	
mouse IFN γ	BioLegend	751806	
mouse IL12	BioLegend	577006	
mouse IL4	BioLegend	574306	
mouse IL6	BioLegend	575706	
mouse IL1 β	义翘神州	50101-MNAE	
mouse TGF- β 1	BioLegend	763104	
anti-Hamster Ig (H+L) Jackson ImmunoResearch 127005160			
6. FBS (Gibco, catalog number: 10270-106, 55 °C 灭活 0.5 h)
 7. PBS (Hyclone, catalog number: SH30256.01B)
 8. RPMI-1640 培养基 (Hyclone, catalog number: SH30027.01)
 9. Penicillin/Streptomycin (Hyclone, catalog number: SV30010)
 10. Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set (Thermo Fisher, eBioscience, catalog number: 00-5523-00)
 11. MojoSort™ Mouse CD4 Naïve T Cell Isolation Kit (BioLegend, catalog number: 480040)
 12. Foxp3 Fixation/Permeabilization buffer
 13. NaCl
 14. KCl
 15. Na₂HPO₄
 16. KH₂PO₄
 17. Milli-Q H₂O
 18. β -巯基乙醇
 19. L-Glutamine
 20. 10× PBS buffer (见溶液配方)
 21. 1× PBS buffer (见溶液配方)
 22. FACS buffer (见溶液配方)
 23. RPMI-1640 完全培养基 (见溶液配方)

24. 2.4G2 buffer (见溶液配方)

仪器设备

1. 流式细胞仪 (Cytotflex S)
2. 电动吸引器 (斯曼峰, model: YX930D)
3. 移液器 (Eppendorf)
4. 正置光学显微镜 (Olympus, model: IX2-SLP)
5. 离心机 (Eppendorf, model: 5810R)
6. 医用低温保存箱 (海尔, model: DW-25L262/BD-226W)
7. 振荡混匀机 (Kylin-bell)
8. 生物安全柜 (LabGard, model: Class II/Labconco)
9. 二氧化碳培养箱 (Panasonic, model: MCO-20AIC)

软件

1. FlowJo

实验步骤

用 eBioscience™ FoxP3/Transcription Factor Staining Buffer Set 试剂盒进行 CD4⁺ T 细胞亚型转录因子的流式染色。染色体系为 96 孔 U 型板。

1. 抗体包被: 1× PBS 稀释抗体 anti-hamster Ig (H + L) (2 μg/ml)。将稀释抗体 100 μl/well 加入 96 孔板, 4 °C 过夜;
2. 取小鼠脾脏, 纯化 naïve CD4⁺ T 细胞, 将纯化的 CD4⁺ T 细胞种在包被过夜的 96 孔板, 加 anti-mCD3 (0.25 μg/ml) 和 anti-mCD28 (1 μg/ml) 刺激, 根据 CD4⁺ T 细胞的体外分化条件诱导成不同亚型的 CD4⁺ T 细胞。诱导不同 CD4⁺ T 细胞亚型需要的阻断抗体和细胞因子如下:

Th1: 10 μg/ml anti-IL-4, 5 ng/ml IL-12, 250 U/ml IL-2

Th2: 5μg/ml anti-IFN-γ, 10 ng/ml IL-4, 250 U/ml IL-2

Th9: 10 μg/ml anti-IFN-γ, 10 ng/ml IL-4, 2 ng/ml TGF-β1

Th17: 10 μg/ml anti-IL-4, 10 μg/ml anti-IFN-γ, 50 ng/ml IL-6, 2 ng/ml TGF-β1

Treg: 1 µg/ml anti-IFN-γ, 1 µg/ml anti-IL-4, 2ng/ml TGF-β1

用 RPMI-1640 完全培养基培养 3~4 d;

3. 收集细胞: 取 10^5 细胞置于 96 孔 U 型板, 加入 100 µl 的 FACS buffer, 500 x g 离心 5 min, 弃去上清;
4. 表面检测抗体配制: 将 0.15 µl anti-mouse CD4 FITC 抗体加入到 25 µl FACS buffer 和 25 µl 2.4G2 (200 ng/ml) 的混合液中, 混匀 (根据样品数量配制适当体积的抗体);
5. 表面抗体染色: 每个样品加入 50 µl 配好的抗体, Vortex 混匀, 4 °C 避光染色 25 min;
6. 准备固定破膜液和破膜液: 固定破膜液按照需要配制合适体积的 Foxp3 Fixation/Permeabilization buffer, 按要求将稀释液和浓缩液 3:1 混合, 破膜液用 ddH₂O 将 10× Permeabilization Buffer 稀释成 1× Permeabilization Buffer;
7. 洗去残余抗体: 将步骤 4 中染色完成的样品加入 150 µl FACS buffer, 500 x g 离心 5 min, 弃去上清, 重复该步骤;
8. 固定破膜: 加入步骤 5 中配制的固定破膜液 FoxP3 Fixation/Permeabilization Buffer 100 µl, vortex 混匀, 常温避光 30~60 min;
9. 洗去固定液: 加入 100 µl 步骤 5 中配好的破膜液 1× Permeabilization Buffer, 500 x g 离心 5 min, 弃去上清, 重复该步骤;
10. 转录因子染色抗体配制和染色: 0.15 µl 转录因子抗体 + 50 µl 1× Permeabilization Buffer, CD4⁺ T 细胞亚型对应的转录因子如下:
 Th1: TBX21
 Th2: GATA3
 Th9: PU.1 和 IRF4
 Th17: ROR-gt
 Treg: FoxP3
 加入配制的转录因子抗体到样品, Vortex 混匀, 4 °C 避光染色 25 min;
11. 洗去残余转录因子抗体: 加入 150 µl 1× Permeabilization Buffer, 500 x g 离心 5 min, 弃去上清, 重复该步骤;
12. 重悬流式分析: 用 60 µl 的 FACS buffer 重悬样品, 流式细胞仪分析样品及 FlowJo 分析 FACS 结果。

结果与分析

以 Treg 细胞的转录因子 Foxp3 为例，展示转录因子的流式染色 (图 1)。

结果分析：纯化的 naïve CD4⁺T 细胞是未分化的 T 细胞，在诱导形成 FoxP3⁺的 Treg 细胞前是很少表达 FoxP3 的，诱导前的流式细胞染色仅有 4% 的细胞是 FoxP3⁺的。在向 Treg 细胞诱导 4 d 后。CD4⁺T 细胞中有 37% 的细胞表达 FoxP3。该结果不仅说明该条件是可以定向诱导 naïve CD4⁺T 细胞分化形成 Treg 细胞，也说明该检测转录因子的方法是有效的。

图 1. 流式检测诱导前后 Treg 细胞的比例

失败经验

1. 为防止染色不均匀，染色前后都要震荡混匀；为防止液体溅出，调整 vortex 至合适的转速。
2. 每次流式仅取少量的细胞，以防止一次实验意外导致无细胞可重复。T 细胞体外分化也要多做一个重复，每个重复仅取部分细胞混匀后鉴定。

溶液配方

1. 10× PBS buffer

NaCl 80 g

KCl 10 g

Na₂HPO₄ 14.4 g

KH₂PO₄ 2.4 g

加入 Milli-Q H₂O 去离子水定容 1 L

2. 1× PBS buffer

将 10× PBS 100ml 加入 Milli-Q H₂O 去离子水定容 1 L

pH 7.2~7.4, 高压灭菌

3. FACS buffer

1× PBS buffer 1 L

血清 20 ml

NaN₃ 0.05%

4. RPMI-1640 完全培养基

RPMI-1640 培养基

9% 胎牛血清

1% Penicillin-Streptomycin

55 μM β-巯基乙醇

L-Glutamine 200mM

5. 2.4G2 buffer

10 μg 2.4G2 加入 50 ml FACS buffer 配成 200 ng/ml

致谢

感谢杨选明实验室全体成员的建议和帮助。该研究受国家自然科学基金 (81671643)、科技部重点研发计划 (2016YFC1303400) 资助。

参考文献

1. Chung, Y., Chang, S. H., Martinez, G. J., Yang, X. O., Nurieva, R., Kang, H. S., Ma, L., Watowich, S. S., Jetten, A. M., Tian, Q. and Dong, C. (2009). [Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling](#). *Immunity* 30(4): 576-587.

2. Flaherty, S. and Reynolds, J. M. (2015). [Mouse Naive CD4⁺ T cell isolation and *in vitro* differentiation into T cell subsets.](#) *J Vis Exp* 98.
3. Kaplan, M. H., Hufford, M. M. and Olson, M. R. (2015). [The development and *in vivo* function of T helper 9 cells.](#) *Nat Rev Immunol* 15(5): 295-307.
4. Mowen, K. A. and Glimcher, L. H. (2004). [Signaling pathways in Th2 development.](#) *Immunol Rev* 202: 203-222.
5. Read, K. A., Powell, M. D., Sreekumar, B. K. and Oestreich, K. J. (2019). [*In vitro* differentiation of effector CD4⁺ T Helper cell subsets.](#) *Methods Mol Biol* 1960: 75-84.
6. Rumble, J. and Segal, B. M. (2014). [*In vitro* polarization of T-helper cells.](#) *Methods Mol Biol* 1193: 105-113.
7. Sekiya, T. and Yoshimura, A. (2016). [*In vitro* Th differentiation protocol.](#) *Methods Mol Biol* 1344: 183-191.
8. Szabo, S. J., Sullivan, B. M., Stemmann, C., Satoskar, A. R., Sleckman, B. P. and Glimcher, L. H. (2002). [Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN-gamma production in CD4 and CD8 T cells.](#) *Science* 295(5553): 338-342.