肠道固有层单核吞噬细胞和细胞因子分泌的流式检测

Flow Cytometry of Intestinal Mononuclear Phagocytic Subsets and Functions

温珍亮^{1,*}, 苏小惠^{2,*}, 陈德昌¹, 张李迪¹, 牛泓深², 沈蕾^{2,#}

¹上海交通大学医学院附属瑞金医院北院重症医学科, 上海; ²上海交通大学医学院免疫学研究所, 上海

*共同第一作者

#通讯作者邮箱: lshen@shsmu.edu.cn

引用格式: 温珍亮, 苏小惠, 陈德昌, 张李迪, 牛泓深, 沈蕾. (2019). 肠道固有层单核吞噬细胞和细胞因子分泌的流式检测. *Bio-101* e1010324. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010324.

How to cite: Wen, Z. L., Su, X. H., Chen, D. C., Zhang, L. D., Niu, H. S. and Shen, L. (2019). Flow Cytometry of Intestinal Mononuclear Phagocytic Subsets and Functions. *Bio-101* e1010324. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010324. (in Chinese)

摘要: 肠道固有层单核吞噬细胞主要包括巨噬细胞和树突状细胞, 依据细胞表面表达的标志物 CD11b、CX3CR1 和 CD103 等表达水平不同分为不同的亚群。尽管各亚群功能各异, 但均在维持肠道稳态中发挥着重要作用。流式细胞术能快速检测单个细胞的生物学性质, 是研究免疫细胞的常用方法。在此, 我们报告一项 10 色 16 参数的流式方案, 以用于检测分析肠道单核吞噬细胞亚群和细胞因子。

关键词: 肠道固有层, 单核吞噬细胞, 巨噬细胞, 树突状细胞

研究背景: 肠道固有层单核吞噬细胞包括巨噬细胞和常规树突状细胞 (conventional dendritic cells, cDCs), 在肠道黏膜稳态、感染和炎症中起重要作用 (Joeris 等, 2017)。和其他组织一样, 肠道固有层巨噬细胞高表达表面抗原 F4/80 及 CD11b, 依据其表面趋化因子受体 CX3CR1 表达水平和功能的不同可分为炎性巨噬细胞 (inflammatory macrophages, IMs) 和驻留巨噬细胞 (resident macrophages, RMs) (Grainger 等, 2017)。前者低表达或中度表达 CX3CR1, 产生肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白介素 1 β (IL-1 β)、白介素 6 (IL-6) 和诱导型一氧化氮合酶 (iNOS), 具有强烈的促炎特性, 负责招募炎性免疫细胞 (如中性粒细胞) 至病变部位, 同时也可限制中性粒细胞功能, 防止炎症过度激活放大 (Grainger 等, 2017)。后者高表达 CX3CR1, 具有很强的吞噬活性, 同时分泌较多白介素 10 (IL-10) 及少量 TNF- α , 维持局部 Treg 数量, 参与组织修复及上

皮再生 (Grainger 等, 2017; Joeris 等, 2017)。同样, 肠道固有层 cDCs 也高表达主要组织相容性复合物 II (MHC-II) 和表面分子 CD11c。尽管肠道 cDCs 有很多种分类方法 (周光炎, 2013; Si 等, 2016; Joeris 等, 2017), 但依据功能不同主要分为效应性 DCs 和调节性 DCs (周光炎, 2013)。前者表达表面分子 CD11b 及 CX3CR1, 分泌白介素 12 (IL-12)、TNF- α 等, 激活 Th1 细胞及 Th17 细胞, 诱导保护性炎症反应; 后者表达整合素 α E (CD103), 不表达 CX3CR1, 分泌 IL-10、TGF- β , 激活 FoxP3⁺Treg, 抑制机体对抗原和共生菌的应答 (周光炎, 2013)。在此, 我们构建一套 10 色 16 参数的流式方案, 首先通过 FSC-A/SSC-A 圈出淋巴细胞, 去除细胞碎片及粘连体。通过 LIVE/DEAD 和 CD45.2 圈出活的 CD45.2⁺免疫细胞, 并使用 Linage (CD3, B220, GR-1) 去除 T 细胞、B 细胞、粒细胞, 以减少干扰。接着将 F4/80⁺CD11b⁺细胞定义为巨噬细胞, 根据 CX3CR1 的表达, 将巨噬细胞分为 IMs (F4/80⁺CD11b⁺CX3CR1^{-/int}) 和 RMs (F4/80⁺CD11b⁺CX3CR1^{hi}); 同时将 F4/80⁻MHC-II⁺CD11c⁺细胞定义为 cDCs, cDCs 可进一步分为两个亚群: 调节性 DCs (CD103⁺CX3CR1⁻) 和效应性 DCs (CD11b⁺CX3CR1⁺)。在这套流式方案里, 我们还加入了细胞因子 (IL-10, TNF- α) 以检测巨噬细胞细胞因子分泌情况。

总之, 我们描述了肠道固有层单核吞噬细胞的获取方法并提出一项 10 色 16 参数的流式方案, 将有助于分离和定义肠道巨噬细胞和 cDCs 这两个群体, 以便进一步的表型分析和功能表征。

材料与试剂

耗材:

1. 1.5 ml 尖底离心管 (Axygen, catalog number: MCT-150-C)
2. 5 ml 带盖离心管 (Axygen, catalog number: SCT-5ML-S)
3. 15 ml 尖底离心管 (Corning, catalog number: 430791)
4. 50 ml 尖底离心管 (Corning, catalog number: 430829)
5. 3 ml 圆头吸管 (Biologix, catalog number: 30-0138A1)
6. 10 μ l 移液器吸头 (Axygen, catalog number: T-300)
7. 200 μ l 移液器吸头 (Axygen, catalog number: T-200-Y)
8. 1,000 μ l 移液器吸头 (Axygen, catalog number: T-1000-B)

9. 10 ml 移液管 (Corning, catalog number: 4488)
10. 90 cm 培养皿 (Bioinspl, catalog number: GD9100)
11. 6 孔板 (Corning, catalog number: 3516)
12. 96 孔板 (Corning, catalog number: 3360)
13. 5 ml Falcon 聚苯乙烯圆底管 (Corning, catalog number: 352052)
14. 70 μ m 滤器 (Corning, catalog number: 352350)
15. 0.22 μ m 滤器 (Millipore, catalog number: SLGP033RB)
16. 剪刀 (苏州施强医疗器械有限公司, catalog number: JYJ1030D)
17. 镊子 (苏州施强医疗器械有限公司, catalog number: JYN1020)
18. 细胞计数板 (Marienfeld, catalog number: 0650030)

动物:

SPF 级野生型 C57BL/6 雄性小鼠 (上海灵畅实验动物有限公司), 8~10 w, 饲养于屏障温控房, 12 h 昼夜交替, 温度 20~22 °C, 湿度 30%~70%。所有实验均经上海交通大学医学院动物护理与使用委员会批准。

抗体:

1. 抗 CD16/32 (克隆号: 93, BioLegend, catalog number: 101320, 工作稀释度 1/50)
2. 抗 CD45.2 (克隆号: 104, eBioscience, catalog number: 56-0454-82, 工作稀释度 1/200)
3. 抗 CD3e (克隆号: 145-2C11, BD Biosciences, catalog number: 557596, 工作稀释度 1/200)
4. 抗 B220 (克隆号: RA3-6B2, BD Biosciences, catalog number: 552094, 工作稀释度 1/200)
5. 抗 Gr-1 (克隆号: RB6-8C5, BioLegend, catalog number: 108424, 工作稀释度 1/200)
6. 抗 F4/80 (克隆号: BM8, eBioscience, catalog number: 17-4801-82, 工作稀释度 1/200)
7. 抗 CD11b (克隆号: M1/70, BioLegend, catalog number: 101256, 工作稀释度 1/200)

- 1/200)
8. 抗 CX3CR1 (克隆号: SA011F11, BioLegend, catalog number: 149023, 工作稀释度 1/200)
9. 抗 MHC-II (克隆号: AF6-120.1, eBioscience, catalog number: 11-5320-82, 工作稀释度 1/200)
10. 抗 CD11c (克隆号: HL3, BD Biosciences, catalog number: 558079, 工作稀释度 1/200)
11. 抗 CD103 (克隆号: M290, BD Biosciences, catalog number: 564322, 工作稀释度 1/200)
12. 抗 IL-10 (克隆号: JES5-16E3, BD Biosciences, catalog number: 563277, 工作稀释度 1/100)
13. 抗 TNF- α (克隆号: MP6-XT22, eBioscience, catalog number: 12-7321-82, 工作稀释度 1/100)

试剂:

1. 胎牛血清 (FBS, Lonsera, catalog number: S711-001S)
2. 胶原酶 VIII (Collagenase VIII, Sigma-Aldrich, catalog number: C2139)
3. 脱氧核糖核酸酶 I (DNase I, Sigma-Aldrich, catalog number: DN25)
4. 二硫苏糖醇 (DTT, Sigma-Aldrich, catalog number: D9779)
5. 乙二胺四乙酸二钠盐二水 ($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 上海生工, catalog number: 205-358-3)
6. 氯化钠 (NaCl, 上海生工, catalog number: 7647-14-5)
7. 磷酸氢二钠十二水 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 上海生工, catalog number: 10039-32-4)
8. 无水磷酸二氢钾 (KH_2PO_4 , 上海生工, catalog number: 7778-77-0)
9. N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-2-乙烷磺酸 (HEPES, Biosharp, catalog number: BS029C)
10. RPMI 1640 (GE, catalog number: SH3080901)
11. Percoll 细胞分离液 (GE, catalog number: 17-0891-011)
12. Brefeldin A Solution (BFA, BioLegend, catalog number: 420601, 工作稀释度 1/1,000)
13. Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set (eBioscience, catalog number: 00-

5523-00)

14. LIVE/DEAD™ Fixable Near-IR Dead Cell Stain Kit-APC-Cy7 (eBioscience , catalog number: L10119, 工作稀释度 1/1,000)
15. Fixation/Permeabilization 原液
16. Fixation/Permeabilization 稀释液
17. 台盼蓝溶液
18. NaOH
19. 丙三醇
20. 1× PBS 缓冲液 (见溶液配方)
21. 10× PBS 缓冲液 (见溶液配方)
22. 1,000× DTT 溶液 (见溶液配方)
23. 0.5 M EDTA (pH 8.0) 溶液 (见溶液配方)
24. 1 M HEPES 溶液 (见溶液配方)
25. 解离液 1 (见溶液配方)
26. 解离液 2 (见溶液配方)
27. 胶原酶 VIII 母液 (见溶液配方)
28. DNA 酶 I 母液 (见溶液配方)
29. 消化液 (见溶液配方)
30. 含 10%FBS 的 RPMI1640 培养液 (见溶液配方)
31. 40% Percoll 溶液 (见溶液配方)
32. 80% Percoll 溶液 (见溶液配方)
33. 细胞死活染料工作液 (见溶液配方)
34. FACS 缓冲液 (见溶液配方)
35. Fc block 工作液 (见溶液配方)
36. 细胞表面抗原抗体混合液 (见溶液配方)
37. Fixation/Permeabilization 工作液 (见溶液配方)
38. Permeabilization 洗液工作液 (见溶液配方)
39. 细胞胞内抗原抗体混合液 (见溶液配方)

仪器设备

1. 高压蒸汽灭菌锅 (TOMY, model: SX-500)
2. 超净工作站 (Thermo Scientific, model: 1300SERIESA2)
3. 台式恒温振荡器摇床 (上海智城, model: ZWY-200D)
4. 冷冻台式离心机 (Thermo Scientific, model: SORVALL ST40R)
5. CO₂ 培养箱 (Thermo Scientific, model: HERACELL 150i)
6. 倒置相差显微镜 (Olympus, model: CKX41)
7. -20 °C 低温冰箱 (Haier, model: DW25L262)
8. 4 °C 冰箱 (Haier, model: HYC-940)
9. 流式分析仪 (BD, model: LSRFortessa)
10. 磁力搅拌器

实验步骤

一. 小鼠肠固有层淋巴细胞制备

1. 颈椎脱臼法处死小鼠，75%酒精喷洒小鼠腹部消毒，于正中纵行剪开腹腔。
2. 小肠上端至胃的幽门，下端至回盲瓣，剥离小肠上的肠系膜即周围组织，然后从腹腔内将小肠完全取出；盲肠下端到肛门为止为大肠，剥离肠系膜及周围组织后取出整个大肠。
3. 将取出的小肠及大肠分别浸泡在装有 4 ml PBS 缓冲液 (1×, 如无特别说明, 后续 PBS 均为 1×) 的 15 ml 离心管中, 并置于冰上。
4. 将小肠及大肠置于含适量 PBS 缓冲液的培养皿上, 小心的用镊子剥离肠壁上的脂肪, 用剪刀剪去派伊尔氏结。
5. 将小肠肠壁沿肠系膜纵行剪开, 在 PBS 缓冲液内涮洗去除肠腔内的污物。大肠处理步骤同小肠类似, 但大肠无派伊尔氏结。
6. 分别将小肠及大肠转移至含 7 ml PBS 缓冲液的 15 ml 离心管中, 转移时剪成大小适宜的小段 (1.5~2 cm), 盖紧盖子快速人工上下剧烈振荡 2 分钟 (视频 1)。

视频 1. 步骤 6 人工振荡频率示意视频

7. 将用 PBS 缓冲液洗过的肠段转移至含 10 ml 解离液 1 (详见溶液配方) 的 50 ml 离心管中，直立放于台式恒温振荡器摇床中 37 °C 下 250 rpm 水平振荡 10 分钟，完成后快速人工上下剧烈振荡 2 分钟 (图 1，视频 2)。

图 1. 解离液 1 处理后小肠及大肠状态图。A. 小肠。B.大肠。

8. 将肠段转移至含 10 ml 解离液 2 (详见溶液配方) 的 50 ml 离心管中，直立放于台式恒温振荡器摇床中 37 °C 下 250 rpm 水平振荡 10 分钟。完成后快速上下剧烈振荡 2 分钟。重复此步骤 1 次 (图 2，视频 2)。

图 2. 解离液 2 处理后小肠及大肠状态图. A. 小肠. B.大肠。

视频 2. 步骤 7~8 人工振荡频率示意视频

9. 将解离后的肠段转移至装有 4 ml 含 10% FBS 的 RPMI1640 培养液 (详见溶液配方) 的 15 ml 离心管中, 上下颠倒 2 分钟 (此步应缓慢轻柔)。把肠段转移至已加入了消化液 (详见溶液配方) 的 6 孔板中, 在转移时把肠段剪成更小 (<0.5 cm) 的碎片, 小肠消化体系为 4 ml, 大肠为 3 ml, 放置于 5% CO_2 培养箱 37 °C 下消化 90 分钟 (图 3)。

图 3. 消化液处理后小肠及大肠状态图. **A.** 小肠. **B.** 大肠。

10. 消化完成后，用吸管将消化后的组织块连同消化液转移至 15 ml 离心管中，加 PBS 缓冲液定容至 7 ml。快速人工上下剧烈振荡 2 分钟后，消化液过 70 μm 滤器至 15 ml 离心管中，定容至 14 ml，500 $\times g$ ，室温离心 5 分钟。
11. 用 4 ml 的 40% Percoll 溶液 (详见溶液配方) 重悬细胞沉淀，将 2.5 ml 的 80% Percoll 溶液 (详见溶液配方) 用滴管加至离心管底部，1,000 $\times g$ 室温离心 20 分钟 (升 1 降 0 或升 5 降 1)。离心完成后先吸去上层的杂质，再用滴管小心的吸出中间层的细胞沉淀于 15 ml 离心管中，用 PBS 缓冲液定容至 14 ml，800 $\times g$ 室温离心 10 分钟 (图 4，视频 3)。

图 4. Percoll 离心之后的分层情况

视频 3. 弃去上层杂质，吸取中间免疫细胞层

12. 离心完成后，用 500 μ l 含 10% FBS 的 RPMI1640 培养液重悬细胞沉淀。取 10 μ l 分离所得的单细胞悬液，加入 10 μ l 台盼蓝溶液，置于倒置相差显微镜下测细胞活力并细胞计数。细胞计数公式为：镜下计数 $\times 10^4 \times 2 \times$ 单细胞悬液体积。

二. 细胞因子分泌阻断

用适量含 10% FBS 的 RPMI1640 培养液 (详见溶液配方) 重悬细胞沉淀, 调整最终细胞浓度至 $5 \times 10^6/\text{ml}$, 取 200 μl 转移至 96 孔板, 每样本加入 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BFA 置于 5% CO_2 培养箱中 37 °C 培养 4 小时, 阻断细胞因子分泌到细胞外。

三. 用于流式分析的细胞染色

1. 将上述培养好的细胞于室温下 400 $\times g$ 离心 5 分钟, 吸去上清 (注意在侧壁吸取, 防止吸走细胞), 留细胞沉淀;
2. 每孔 (以下均为每孔) 加入 100 μl 细胞死活染料工作液 (详见溶液配方) 重悬细胞沉淀 (轻轻吹打混匀, 不要产生气泡), 室温避光孵育 20 分钟;
3. 孵育结束后加入 150 μl PBS 缓冲液室温下 400 $\times g$ 离心 5 分钟, 吸去上清, 留细胞沉淀;
4. 加入 40 μl Fc block 工作液 (详见溶液配方) 重悬细胞沉淀, 4 °C 避光孵育 10 分钟 (或室温 5 分钟), 阻断非特异性 Fc 介导的相互作用;
5. 孵育结束后无需清洗, 直接加入 20 μl 表面抗原抗体混合液 (详见溶液配方), 轻轻吹打混匀细胞, 4 °C 避光孵育 30 分钟;
6. 孵育结束后加入 150 μl FACS 缓冲液 (详见溶液配方), 室温下 400 $\times g$ 离心 5 分钟, 吸去上清, 留细胞沉淀;
7. 加入 80 μl 的 Fixation/Permeabilization 工作液 (详见溶液配方) 重悬细胞沉淀, 4 °C 避光孵育 45~60 分钟 (或过夜);
8. 孵育结束后加入 150 μl Permeabilization 洗液 (详见溶液配方), 室温下 500 $\times g$ 离心 5 分钟, 吸去上清, 留细胞沉淀;
9. 加入 50 μl 细胞内抗原抗体混合液 (详见溶液配方), 重悬细胞, 4 °C 避光孵育 45~60 分钟;
10. 孵育结束后加入 200 μl Permeabilization 洗液, 室温下 500 $\times g$ 离心 5 分钟, 吸去上清, 留细胞沉淀;
11. 加入 200 μl FACS 缓冲液重悬细胞沉淀, 70 μm 滤器过滤后转移至流式管, 再加入 100 μl FACS 缓冲液混匀后等待上机进行流式分析, 若暂时不上机, 请置于 4 °C 冰箱保存, 保存时间建议不超过 24 小时。

四. 上机流式检测及数据分析

样本由 BD LSRFortessa 流式细胞仪检测。每个样本收集总 Events 数量为 300,000 个。采用 FlowJo 10.5.3 软件分析，设门方法见图 5。首先通过 FSC-A/SSC-A 圈出淋巴细胞，去除细胞碎片及粘连体。通过 LIVE/DEAD 和 CD45.2 圈出活的 CD45.2⁺免疫细胞，并使用 Linage (CD3,B220,GR-1) 去除 T 细胞、B 细胞、粒细胞，以减少干扰。接着将 F4/80⁺CD11b⁺细胞定义为巨噬细胞，根据 CX3CR1 的表达，将巨噬细胞分为 IMs (F4/80⁺CD11b⁺CX3CR1^{-int}) 和 RMs (F4/80⁺CD11b⁺CX3CR1^{hi})；同时将 F4/80-MHC-II⁺CD11c⁺细胞定义为 cDCs，根据 CD103、CX3CR1 和 CD11b 的表达情况，cDCs 进一步分为两个亚群：调节性 DCs (CD103⁺CX3CR1⁻) 和效应性 DCs (CD11b⁺CX3CR1⁺)。最后分别从 IMs 和 RMs 细胞中检测 IL-10 及 TNF- α 的表达。

设门结束后记录各细胞群的细胞比例及 Count。最后分析巨噬细胞亚群分泌 IL-10 和 TNF- α 的比例。各细胞群细胞绝对数 = (各细胞群 Count)/(Total Count) × 细胞计数。Total Count 是指流式软件中指除去死细胞及碎片外的所有 Count，细胞计数是指各样本单细胞悬液总活细胞数。

图 5. 肠道固有层单核吞噬细胞设门策略. A. 大肠固有层单核吞噬细胞设门策略; B. 小肠固有层单核吞噬细胞设门策略。Lin, Linage (CD3,B220,GR-1); LivenonTBG CD45.2⁺Cells, 除 T、B、粒细胞之外活的免疫细胞; Macs, Macrophages, 巨噬细胞; IMs, inflammatory macrophages, 炎性巨噬细胞; RMs, resident macrophages, 驻留巨噬细胞; DCs, 树突状细胞; effector DCs, 效应性 DCs; Regulatory DCs, 调节性 DCs。

结果与分析

使用该 Protocol 可从 7~8 周龄雄性 C57BL/6 小鼠小肠中获取的活细胞平均数量约为 $4\sim6 \times 10^6$ 个细胞, 大肠的平均活细胞数约为 $3\sim5 \times 10^6$, 死亡细胞比例小于 10%。在排除 T、B 及粒细胞干扰后, 在剩余所有肠道 CD45.2⁺活细胞中, 小肠有 $(9.556 \pm 0.465)\%$ 的 DCs, 其中, CD11b⁺CX3CR1⁺DCs 占 $(19.460 \pm 3.883)\%$, CD103⁺CX3CR1⁺DCs 的比例为 $(58.18 \pm 5.538)\%$; 小肠 Macs 约占 CD45.2⁺Lin⁺活细胞的 $(7.258 \pm 1.104)\%$, 其中, IMs 的比例为 $(58.700 \pm 11.260)\%$, RMs 的比例为 $(40.160 \pm 11.180)\%$ 。大肠单核吞噬细胞比例总体上和小肠类似, 但 RMs 略多。大肠有 $(8.392 \pm 0.6873)\%$ 的 CD45.2⁺Lin⁺活细胞是 DCs, 其中, CD11b⁺CX3CR1⁺DCs 约占 $(11.020 \pm 2.220)\%$, CD103⁺CX3CR1⁺DCs 的比例为 $(60.020 \pm 5.056)\%$; 而 Macs 在 CD45.2⁺Lin⁺活细胞比例为 $(8.833 \pm 0.9149)\%$, 其中, IMs 占 $(36.900 \pm 5.298)\%$, RMs 为 $(61.420 \pm 5.513)\%$ 。稳态情况下, 平均不到 $(6.758 \pm 2.216)\%$ 的小肠 IMs 分泌 TNF- α , 其分泌 IL-10 的比例更低, 为 $(1.576 \pm 0.2485)\%$; 然而, 平均有 $(11.010 \pm 1.873)\%$ 的 RMs 分泌 IL-10,

(38.660 ± 4.933)%的 RMs 分泌 TNF- α 。大肠巨噬细胞分泌 IL-10 及 TNF- α 的情况和小肠类似。由此可见，稳态下，肠道巨噬细胞处于激活状态的主要是 RMs，这也间接提示 RMs 是维持肠道稳态的主要巨噬细胞。

失败经验

1. 可能犯错的步骤或失败的经验

解离液 2 清洗步骤未重复、人工振荡步骤用力过小、向 40% Percoll 细胞分离液中添加 80% Percoll 细胞分离液时用力过猛，均可能导致分离获取的肠道固有层单个核细胞数量明显减少。

2. 补救经验

严格执行实验步骤一(8)：人工振荡步骤用力适中；向 40% Percoll 细胞分离液中添加 80% Percoll 细胞分离液时用力轻柔。

溶液配方

1. 10× PBS 缓冲液

NaCl	90 g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	12 g
KH ₂ PO ₄	1.44 g

加双蒸水 800 ml，置于磁力搅拌器用磁力搅拌子搅拌溶解，然后用双蒸水定容至 1,000 ml，无需调节 pH 值，分装后 121 °C 高压灭菌 30 分钟，4 °C 保存

2. 1× PBS 缓冲液

PBS 缓冲液 (10×) 100 ml 加入无菌三蒸水 900 ml，混匀后 4 °C 保存

3. 1,000× DTT 溶液

DTT 1 g 溶于 6.483 ml 无菌三蒸水，配成 1 M 母液

通过 0.22 μ m 滤器过滤除菌后分装成 200 μ l 每管，-20 °C 保存

4. 0.5 M EDTA (pH8.0) 溶液 (1 L)

在 800 ml 去离子水中加入 186.1 g Na₂EDTA·2H₂O

在磁力搅拌器上 40 °C 加温搅拌溶解

用 NaOH 调节溶液的 pH 值至 8.0 (约需 20 g NaOH 颗粒)，然后稀释至 1L

分装后 121 °C 高压灭菌 30 分钟备用，4 °C 保存

5. 1 M HEPES 溶液 (100 ml)

将 23.8 g HEPES 溶于约 90 ml 的去离子水中

用 NaOH 调节溶液的 pH 值至 8.0，然后用水定容至 100 ml

121 °C 高压灭菌 30 分钟，4 °C 保存

6. 解离液 1

每 10 ml PBS 缓冲液 (1×) 加 1 mM DTT 和 10 mM HEPES (pH 8.0)

混匀后室温保存，每样本需 10 ml 解离液 1

7. 解离液 2

每 10 ml PBS 缓冲液 (1×) 加 30 mM EDTA (pH 8.0) 和 10 mM HEPES (pH 8.0)

混匀后室温保存，每样本需 10 ml 解离液 2

8. 含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养液

以 50 ml 为例，45 ml RPMI 1640 加入 FBS 5 ml，混匀后 4 °C 保存

9. 胶原酶 VIII 母液

取 1 g Collagenase VIII (效价为 801 CDU/mg) 加入 8.01 ml 无菌不含血清的 RPMI 1640，母液浓度为 100 kU/ml

通过 0.22 μm 过滤器过滤除菌后分装成 500 μl 每管，-20 °C 保存

10. DNA 酶 I 母液 (1,000×)

1 ml 丙三醇加入 9 ml PBS 缓冲液配制溶剂，0.22 μm 过滤器过滤除菌

取 6.67 ml 过滤过的溶剂加到 DNase I (1 g) 的瓶子里 (固体很蓬松、溶解很粘稠，尽量不要搅动让其自然溶解，不然容易沾到枪头上，造成损失)，母液浓度为 150 mg/ml，分装成 200 μl 每管，-20 °C 保存

11. 消化液

小肠消化液：在含 10% FBS 的 RPMI 1640 中加入 100~200 U/ml Collagenase VIII (Collagenase VIII 浓度需根据其效价及小鼠的品系、肠道长度进行调整)，0.15 mg/ml DNase I，混匀后在室温下静置至少 5 min 后使用，体系为 4 ml/样本

大肠消化液：在 10% FBS 的 RPMI 1640 中加入 200~400 U/ml Collagenase V III (Collagenase VIII 浓度需根据其效价及小鼠的品系、肠道长度进行调整)，0.15 mg/ml DNase I，混匀后在室温下静置至少 5 min 后使用，体系为 3 ml/样本

12. 40% Percoll 溶液

Percoll 细胞分离液与 PBS 缓冲液 (10×) 按体积比 9:1 混合，配制等渗 100% Percoll 母液

用 100% Percoll 母液和 RPMI 1640 按体积比 4:6 混合，配制 40%等渗 Percoll 溶液

13. 80% Percoll 溶液

Percoll 细胞分离液与 PBS 缓冲液 (10×) 按体积比 9:1 混合，配制等渗 100% Percoll 母液

用 100% Percoll 母液和 RPMI 1640 按体积比 8:2 混合，配制 80%等渗 Percoll 溶液

14. 细胞死活染料工作液

LIVE/DEAD™ Fixable Near-IR Dead Cell Stain Kit 按说明书配制 1,000× 细胞死活染料母液

用 PBS 缓冲液 (1×) 按 1:1,000 稀释细胞死活染料母液，混匀后 4 °C 保存，100 μl/样

15. FACS 缓冲液

以 50 ml 为例，0.5 ml FBS 和 0.1 ml EDTA (0.5 M, pH 8.0) 加入 50 ml PBS 缓冲液 (1×) 中，混匀后 4 °C 保存

16. Fc block 工作液

用 FACS 缓冲液按 1:50 稀释抗 CD16/32 抗体
混匀后 4 °C 保存，40 μl/样

17. 细胞表面抗原抗体混合液 (以下抗体用于制备细胞表面抗原抗体混合液)

抗 CD45.2-Alexa Fluor700 (克隆号：104)

抗 CD3e-APC-Cy7 (克隆号：17A2)

抗 B220-APC-Cy7 (克隆号：RA3-6B2)

抗 Gr-1-APC-Cy7 (克隆号：RB6-8C5)

抗 F4/80-APC (克隆号: BM8)

抗 CD11b-PE/Dazzle™ 594 (克隆号: M1/70)

抗 CX3CR1-BV421 (克隆号: SA011F11)

抗 MHC-II-FITC (克隆号: AF6-120.1)

抗 CD11c-PE-Cy7 (克隆号: HL3)

抗 CD103-BV786 (克隆号: M290)

将上述抗体按 1:200 依次加入 FACS 缓冲液中, 混匀后 4 °C 保存, 20 µl/样

18. Fixation/Permeabilization 工作液

Fixation/Permeabilization 原液用 Fixation/Permeabilization 专用稀释液稀释 (Fixation/Permeabilization 原液:Fixation/Permeabilization 专用稀释液稀释 = 1:3), 混匀后 4 °C 保存, 80 µl/每样

19. Permeabilization 洗液工作液

Permeabilization 洗液原液用三蒸水稀释 (Permeabilization 洗液原液:三蒸水 = 1:9), 4 °C 保存

20. 细胞胞内抗原抗体混合液 (以下抗体用于制备细胞胞内抗原抗体混合液)

抗 IL-10-BV510 (克隆号: JES5-16E3)

抗 TNF-α-PE (克隆号: MP6-XT22)

将上述抗体按 1:100 依次加入 Permeabilization 洗液中, 混匀后 4 °C 保存, 50 µl/样

致谢

感谢上海市免疫学研究所沈蕾实验室提供实验场所, 以及实验室各位研究生同学对本实验方法的帮助及改进。这项工作得到了国家自然科学基金项目 (81571943, 81571533, 81873944) 的支持。

参考文献

1. 周光炎 (2013). 免疫学原理(第三版). 科学出版社.

2. Grainger, J. R., Konkel, J. E., Zangerle-Murray, T. and Shaw, T. N. (2017). [Macrophages in gastrointestinal homeostasis and inflammation.](#) *Pflugers Arch* 469(3-4): 527-539.
3. Joeris, T., Muller-Luda, K., Agace, W. W. and Mowat, A. M. (2017). [Diversity and functions of intestinal mononuclear phagocytes.](#) *Mucosal Immunol* 10(4): 845-864.
4. Si, C., Zhang, R., Wu, T., Lu, G., Hu, Y., Zhang, H., Xu, F., Wei, P., Chen, K., Tang, H., Yeretssian, G. and Xiong, H. (2016). [Dendritic cell-derived nitric oxide inhibits the differentiation of effector dendritic cells.](#) *Oncotarget* 7(46): 74834-74845.