

P-12 如何用CFSE标记细胞

. 试剂内含

CFSE 1 mg × 1管

. 试剂配制

1. 从冰箱中取出CFSE试剂，放至室温后再打开。盛放CFSE的管子开盖前请轻弹管壁几次，让粉末充分落入管底，必要时可采用离心的方法。
2. 取0.9 ml DMSO[®]加到CFSE管中溶解，配制成2 mM的CFSE储存液^{b)} (加入DMSO后请先盖上盖子，反复颠倒把盖子和管壁上的试剂洗到底部，并用移液器反复吹打使溶解完全)。
3. 用PBS(-)或适当的缓冲液将其稀释成100 μM或其它浓度 (如果采用载玻片观察法，建议浓度为20 μM) 的工作液^{c)}。
 - a) DMSO需要保证新鲜无水，否则将会导致酯水解，使荧光染料无法进入细胞，影响实验效果。
 - b) 由于CFSE母液遇水极易分解，所以建议分装保存，例如分装成5 μl/管。
方法：分装后用封口膜密封管口，再用锡箔纸包裹，最后和干燥剂一起用塑料袋密封，-20 °C 冷冻保存。
 - c) CFSE工作液应现配现用，因为CFSE吸水会分解，影响染色效果。

* PBS(-)：不含钙和镁离子的PBS。

建议您在正式实验前先摸索一下细胞量、CFSE的终浓度、培养时间等，找到最佳实验条件。

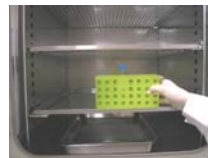
. 细胞染色



准备1 ml细胞悬液，用PBS(-)等合适的培养基调整细胞浓度至约 10^6 个/ml。



取500 μl细胞悬液至试管中，加入适量浓度的CFSE工作液(终浓度为5 μM)，轻轻搅拌均匀。



在37 °C 培养箱中培养15-30 min。



离心后去上清，加入2 ml PBS溶液，再离心后去上清，重复此操作一次。



加入合适的培养基制成细胞悬液。



使用流式细胞仪分析细胞繁殖。

. CFSE染色检测例

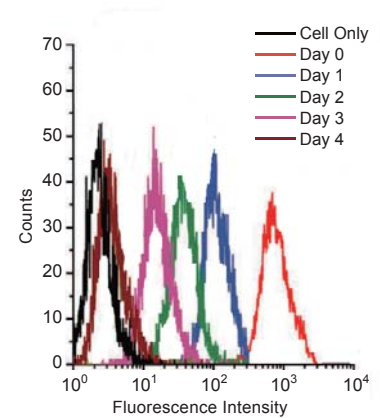


图1. CFSE标记3T3-L1细胞，荧光强度随细胞分裂(天数)减弱。

尽可能用不含血清的培养基，血清中的酶和蛋白质会分解CFSE，可能会影响染色效果。
细胞悬液体积、浓度与CFSE终浓度可根据实验情况自行调整。

. 参考文献

1. Akihiro Shimba, *et al.*, Glucocorticoids Drive Diurnal Oscillations in T Cell Distribution and Responses by Inducing Interleukin-7 Receptor and CXCR4, *Immunity*, **2018**, *48*, 1-13
2. Akiko Yonekawa, *et al.*, Dectin-2 Is a Direct Receptor for Mannose-Capped Lipoarabinomannan of Mycobacteria, *Immunity*, **2014**, *41*, 402-413
3. Kenichi Asano, *et al.*, CD169-Positive Macrophages Dominate Antitumor Immunity by Crosspresenting Dead Cell-Associated Antigens, *Immunity*, **2011**, *34*, 85-95
4. Kohei Kometani, *et al.*, CIN85 drives B cell responses by linking BCR signals to the canonical NF-κB pathway, *The Journal of Experimental Medicine*, **2011**, *208*(7), 1447-1457
5. Makoto Miyara, *et al.*, Functional Delineation and Differentiation Dynamics of Human CD4⁺ T Cells Expressing the FoxP3 Transcription Factor, *Immunity*, **2009**, *30*, 899-911
6. Yasushi Onishi, *et al.*, Foxp3⁺ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation, *Proc.Natl.Acad.Sci.*, **2008**, *105*(29), 10113-10118
7. Keiji Hirota, *et al.*, T cell self-reactivity forms a cytokine milieu for spontaneous development of IL-17⁺ Th cells that cause autoimmune arthritis, *The Journal of Experimental Medicine*, **2007**, *204*(1), 41-47
8. Tetsuo Yamazaki, *et al.*, Contribution of BCAP to maintenance of mature B cells through c-Rel, *Nature Immunology*, **2003**, *4*(8), 780-786