

人 CD4⁺T 细胞分选试剂盒

产品描述:

人 CD4⁺T 细胞分选试剂盒是通过阴性分选法从人外周血单个核细胞 (PBMC) 中分离出 CD4⁺T 细胞。原理是利用生物素 (biotin) 标记的单克隆抗体对非目标细胞 (非 CD4⁺T 细胞) 进行标记, 然后通过链霉亲和素 (streptavidin) 标记的磁珠对非目标细胞进行清除, 从而达到纯化人 CD4⁺T 细胞的目的。分选过程需要用到磁力架。

规格和组分:

组分名称	Cat.No.:RG11-702-100 规格 (For 1×10^9 cells)	Cat.No.:RG11-702-50 规格 (For 5×10^8 cells)
Biotin-Antibody Mix	200 μ L	100 μ L
Streptavidin-Beads	2 mL	1 mL

储存条件: 2-8°C 保存, 不可冷冻, 有效期见试管标签。

适用范围: 本试剂盒适用于从新鲜分离的人 PBMC 或冻存的人 PBMC 中分选出 CD4⁺T 细胞。

设备和试剂要求:

缓冲液: FACS Buffer (不含钙镁离子的 PBS+2 mM EDTA+2% FBS)

Ficoll 细胞分离液、无菌红细胞裂解液、计数液

耗材: 离心管、无菌流式管

仪器: 离心机、磁力架

样本制备:

制备人 PBMC: 利用 Ficoll 密度梯度离心法从人外周血中分离 PBMC, 收集 PBMC, 以 PBS 洗涤细胞, 离心后将 PBMC 重悬于分选 Buffer 中, 调整细胞密度为 1×10^8 cells/mL。

温馨提示:

1. 建议选用低吸附移液器吸头和离心管, 避免因吸附造成磁珠和抗体的损耗;
2. 如果使用冻存的 PBMC 进行分选, 需要用 DNase I 处理后再进行分选;
3. 如果单次分选少于 1×10^7 cells, 则将细胞悬液体积补至 100 μ L, 加入 2 μ L Biotin-Antibody Mix 和 10 μ L Streptavidin-Beads;
4. 5 mL 流式管分选范围为 1×10^7 cells 至 2×10^8 cells, 此范围内分选效果最佳;
5. 确保每一步无菌操作, 谨防污染。

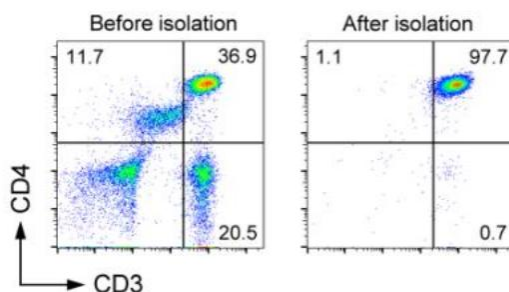
操作步骤:

步骤	说明	剂量和时间
1	将制备好的单细胞悬液转移至 1.5 mL 或 15 mL 无菌离心管*	1×10^8 cells/mL
2	加入 Biotin-Antibody Mix 至细胞悬液	20 μ L/mL
3	轻轻吹打混匀抗体和细胞, 孵育	4°C, 孵育 15 min
4	补 10 倍悬液体积的分选 Buffer 加至离心管, 离心洗涤细胞	500 g, 离心 5 min
5	弃上清, 加原本悬液体积的分选 Buffer 重悬细胞	1×10^8 cells/mL
6	涡旋震荡磁珠 (Streptavidin-Beads) 30s 后, 取步骤 5 中需要用的磁珠用量至 1.5 mL 离心管, 加入 1 mL Buffer, 离心清洗磁珠, 洗两次	10000 g, 离心 1 min
7	加入清洗过的 Streptavidin-Beads 混悬液至细胞悬液	100 μ L/mL
8	轻轻吹打混匀磁珠和细胞, 孵育	4°C, 孵育 10 min
9	加入 Buffer 到样品中定容至指定体积	定容至 2.5 mL
10	吹打混匀后, 将样品 (不带盖) 置于磁力架上, 使磁珠吸附	室温静置 5 分钟
11	手持磁力架, 将细胞悬液轻柔倒入无菌离心管中	此细胞悬液中即为纯化的 CD4 ⁺ T 细胞

*细胞数小于 1×10^7 cells 用 1.5 mL 离心管, 细胞数大于 1×10^7 cells 用 15 mL 离心管。

若想提高纯度, 可在第 11 步之后重复步骤 6-11 进行二次纯化, 此操作可提高纯度 2%-4%。

分选效果:



从人 PBMC 中分选 CD4⁺T 细胞, 用 PE 标记的 anti-human CD4 抗体 (克隆号 RPA-T4) 和 APC 标记的 anti-human CD3 抗体 (克隆号 OKT3) 染色后进行流式细胞分析, 分选前后的 CD3⁺CD4⁺T 细胞纯度分别为 36.9%和 97.7%。