

小鼠CD4⁺细胞分选试剂盒

➤ 产品描述:

小鼠CD4⁺细胞分选试剂盒（阳选法）适用于从小鼠脾脏细胞或其它组织的单细胞悬液中分选出CD4⁺细胞。原理是利用 CD4 Capture Antibody 对CD4⁺细胞进行标记，然后通过 Releasable-Beads 对目标细胞进行捕获，再用 Release Buffer将磁珠从细胞表面解离，从而得到无磁珠标记的小鼠CD4⁺细胞。分选得到的CD4⁺细胞可应用于下游的分子生物学和细胞生物学实验。

➤ 产品组分:

组分名称	Cat.No.:RG11-802-100 规格 (For 1×10 ⁹ cells)	Cat.No.:RG11-802-200 规格 (For 2×10 ⁹ cells)
CD4 Capture Antibody	200 μL	400 μL
Releasable-Beads	2 mL	4 mL
Release Buffer	40 mL	80 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:** 本试剂盒适用于分选小鼠淋巴器官，如脾脏和淋巴结中的CD4⁺细胞。

➤ 操作流程:

以分选小鼠脾脏CD4⁺细胞为例:

1. 制备单细胞悬液: 在70 μm细胞筛网上研磨脾脏，用预冷的PBS冲洗筛网，收集细胞悬液于50 mL离心管中，500 g离心5分钟。

注意: 研磨时间不宜过长，可控制在1min内，否则可能会有死细胞和细胞碎片干扰。

2. 红细胞裂解: 离心结束，弃上清，加入5 mL红细胞裂解液（ACK），室温裂解5分钟，再加入20 mL PBS，500 g离心5分钟。

注意: 红细胞裂解步骤可根据所用裂解液不同调整用量及时间。少量红细胞残留不会影响后续分选及细胞纯度。

3. 过滤与计数: 离心结束，弃上清，将脾细胞重悬于1 mL PBS中，用70 μm细胞筛网过滤后，计数。计数后，500 g离心5分钟。

注意: 细胞悬液需要过细胞筛网，以除去组织和细胞团块，否则会影响后续细胞分选纯度。

4. 制备分选悬液: 离心结束，弃上清，将细胞重悬于分选buffer中，调整细胞密度为1×10⁸ cells/mL。

注意: 分选buffer为含有2% FBS和2mM EDTA的PBS，缓冲液应该不含Ca²⁺和Mg²⁺，需预先通过0.22 μm滤膜过滤除菌。

5. 抗体孵育: 将500 μL细胞悬液（5×10⁷个细胞）加入5 mL无菌流式管底部，加入10 μL CD4 Capture Antibody，轻轻吹打混匀，4°C孵育15分钟。

注意: 加入细胞悬液时将细胞加入流式管底部，避免沿流式管管壁加入；流式管选用聚苯乙烯材质；根据所使用磁力架特点也可使用离心管进行细胞分选；说明书以5×10⁷个细胞量举例，如果分选其他数量细胞，则按比例调整CD4 Capture Antibody用量。

6. 磁珠预处理：涡旋震荡重悬磁珠 (Releasable-Beads) ，吸取100 μL 磁珠至1.5 mL离心管，加入1 mL分选buffer，10000 g离心1 min，弃上清。重复洗涤1次。清洗后用100 μL 分选buffer进行重悬。

注意：buffer与磁珠最终是1:1等比例混匀，如清洗100 μL 磁珠 (Releasable-Beads) ，则最终用100 μL buffer重悬。

7. 磁珠孵育：加入100 μL 清洗过的Releasable-Beads混悬液，轻轻混匀，4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育15分钟。

注意：说明书以 5×10^7 个细胞量举例，如果分选其他数量细胞，则按比例调整Releasable-Beads用量。

8. 磁力分离：孵育完成后，在流式管中加入分选 buffer 至分选体系总体积为2.5 mL，混匀后，将流式管置于磁力架上，静置 5 min。

注意：补buffer时用移液器上下混合吹打5次混匀，操作轻柔，避免剧烈振荡或者上下颠倒混匀。

9. 重复分离：吸出并丢弃上清液。将流式管从磁力架上取下，迅速加入 2 mL 分选 buffer ，用移液器反复吹打分散磁珠后，将流式管置于磁力架上，静置 5 min。

10. 重复步骤9两次。

注意：彻底的清洗可以保证后续洗脱高纯度的目的细胞。

11. 捕获磁珠：磁吸结束后，吸出并丢弃上清液。将流式管从磁力架上取下，迅速加入 1 mL Release Buffer 重悬磁珠，避免磁珠干燥，将磁珠悬液转移至 1.5 mL 离心管中，室温旋转孵育 10 分钟。

注意：分选其它数量细胞时可按比例调整 Release Buffer 的用量。

12. 解离磁珠：孵育完成后，用移液器反复吹打至少 10 次，将磁珠悬液转移至一个新的流式管中，补加分选 buffer 至 2.5 mL，吹打混匀，将流式管置于磁力架上，静置 5 分钟。

13. 收集目的细胞：手持磁力架，将细胞悬液轻柔倒入无菌15 mL离心管中，此细胞悬液中即包含无磁珠标记的小鼠CD4⁺细胞。

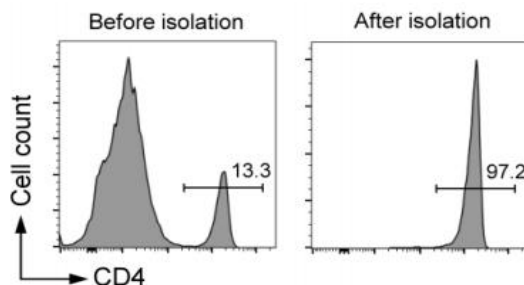
14. 将流式管从磁力架上取下，重复步骤11-13，并将上清液与第一次洗脱后的细胞上清液混合。

15. 洗涤与重悬：500 g离心5分钟，弃上清，根据实验需要洗涤细胞后，将细胞重悬于所需缓冲液或培养基中，可用于后续分子生物学或细胞生物学实验。

➤ 注意事项：

1. 试剂盒各组份使用和保存过程中应避免冷冻；
2. 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；
3. 如果单次分选少于 1×10^7 cells，则将细胞悬液体积补至100 μL ，加入2 μL CD4 Capture Antibody、20 μL Releasable-Beads和200 μL Release Buffer。
4. 本产品需与磁性分离器配套使用；
5. 本产品仅供研究使用。

➤ 分选效果：



从 BALB/c 小鼠脾脏细胞中分选 CD4⁺细胞，用 PE 标记的 anti-mouse CD4 抗体 (克隆号 RM4-4) 染色后进行流式细胞分析，分选前后的 CD4⁺细胞纯度分别为 13.3%和 97.2%。