

# 小鼠CD8<sup>+</sup>细胞分选试剂盒

## ➤ 产品描述:

小鼠CD8<sup>+</sup>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CD8<sup>+</sup>细胞。原理是利用 CD8 Capture Antibody 对CD8<sup>+</sup>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CD8<sup>+</sup>细胞。分选得到的CD8<sup>+</sup>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.:RG11-803-100 规格 (For 1×10 <sup>9</sup> cells)	Cat.No.:RG11-803-200 规格 (For 2×10 <sup>9</sup> cells)
CD8 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CD8<sup>+</sup>细胞。

## ➤ 操作流程:

以分选小鼠脾脏CD8<sup>+</sup>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1×10<sup>8</sup> cells/mL。

**注意:** 分选buffer为含有2% FBS和2mM EDTA的PBS，缓冲液应该不含Ca<sup>2+</sup>和Mg<sup>2+</sup>，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（5×10<sup>7</sup>个细胞）加入5 mL无菌流式管底部，加入10 μL CD8 Capture Antibody，轻轻吹打混匀，4°C孵育10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5×10<sup>7</sup>个细胞量举例，如果分选其他数量细胞，则按比例调整CD8 Capture Antibody用量。

**6. 磁珠预处理:** 涡旋震荡重悬磁珠 (Releasable-Beads), 吸取100  $\mu$ L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  $\mu$ L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  $\mu$ L磁珠 (Releasable-Beads), 则最终用100  $\mu$ L buffer重悬。

**7. 磁珠孵育:** 加入100  $\mu$ L清洗过的Releasable-Beads混悬液, 轻轻混匀, 4 $^{\circ}$ C孵育10分钟。

**注意:** 说明书以 $5 \times 10^7$ 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则按比例调整 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CD8+细胞。

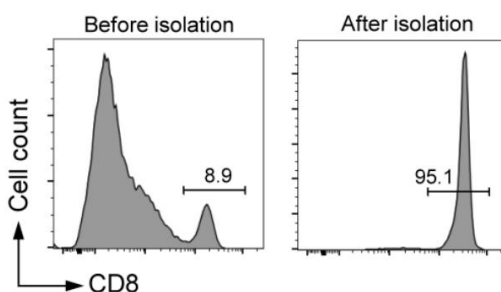
**14. 将流式管从磁力架上取下, 重复步骤11-13, 并将上清液与第一次洗脱后的细胞上清液混合 (此为目的细胞悬液)。**

**15. 洗涤与重悬:** 将目的细胞悬液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. 试剂盒各组分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 $1 \times 10^7$  cells, 则将细胞悬液体积补至100  $\mu$ L, 加入2  $\mu$ L CD8 Capture Antibody、20  $\mu$ L Releasable-Beads和200  $\mu$ L 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 C57BL/6 小鼠脾脏细胞中分选 CD8+细胞, 用FITC标记的 anti-mouse CD8抗体 (克隆号 53-5.8) 染色后进行流式细胞分析, 分选前后的 CD8+细胞纯度分别为 8.9%和 95.1%。