

# 小鼠CD4<sup>+</sup>T细胞分选试剂盒

## ➤ 产品描述:

小鼠CD4<sup>+</sup>T细胞分选试剂盒是通过阴性分选法从小鼠脾脏细胞或其它组织的单细胞悬液中分离出CD4<sup>+</sup>T细胞。原理是选用不同的生物素 (biotin) 标记单克隆抗体对非目的细胞 (非CD4<sup>+</sup>T细胞) 进行标记, 而后通过链霉亲和素 (streptavidin) 标记的磁珠去除非目标细胞, 从而达到小鼠CD4<sup>+</sup>T细胞分选的目的。分选过程需要用到磁极或者磁力架。

## ➤ 规格和组分:

组分名称	Cat.No.:RG11-902-100 规格 (For 1×10 <sup>9</sup> cells)	Cat.No.:RG11-902-50 规格 (For 5×10 <sup>8</sup> cells)
Biotin-Antibody Mix	200 μL	100 μL
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:** 本试剂盒适用于分选小鼠脾脏和淋巴结样本。

## ➤ 操作流程:

以分选小鼠脾脏CD4<sup>+</sup>T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100 μL细胞悬液 (1×10<sup>7</sup>个细胞) 加入5 mL无菌流式管底部, 加2 μL Biotin-Antibody Mix, 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1×10<sup>7</sup>个细胞量举例, 如果分选更多细胞, 则按比例增加Biotin-Antibody Mix用量。

**6. 磁珠预处理:** 涡旋震荡重悬磁珠 (Streptavidin-beads), 吸取20  $\mu\text{L}$ 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20  $\mu\text{L}$ 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50  $\mu\text{L}$ 磁珠 (Streptavidin-beads), 则最终用50  $\mu\text{L}$  buffer重悬。

**7. 磁珠孵育:** 加入20  $\mu\text{L}$ 清洗过的Streptavidin-Beads混悬液, 轻轻混匀, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育10分钟。

**注意:** 说明书以 $1 \times 10^7$ 个细胞量举例, 如果分选更多细胞, 则按比例增加Streptavidin-beads用量。

**8. 磁力分离:** 孵育完成后, 加入2.5 mL分选buffer, 充分混匀, 将流式管置于磁力架上静置5分钟。

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

**9. 收集细胞:** 手持磁力架, 将细胞悬液轻柔倒入无菌离心管中, 此细胞悬液中即包含纯化的小鼠CD4 $^{+}$ T细胞。

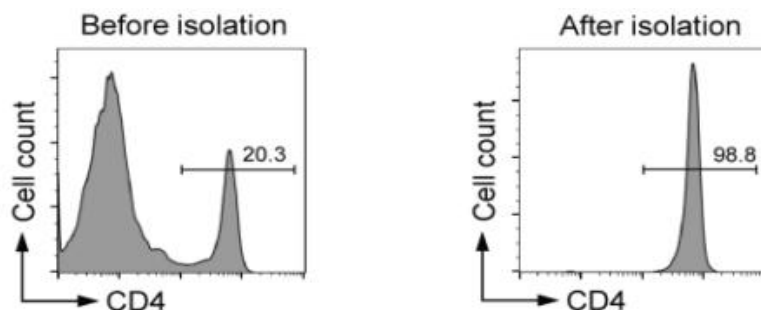
**注意:** 倾倒过程中流式管不要脱离磁力架。

**10. 洗涤与重悬:** 将收集的细胞悬液离心, 500 g离心5 min后, 弃上清, 收集细胞。可根据实验需要洗涤细胞, 之后将细胞重悬于所需缓冲液或培养基中, 即可用于后续分子生物学或细胞生物学实验。

### ➤ 注意事项:

1. 磁珠和抗体混合液使用和保存过程中均应避免冷冻、高速离心等操作;
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  $\mu\text{L}$ , 加入2  $\mu\text{L}$  Biotin-Antibody Mix和20  $\mu\text{L}$  Streptavidin-Beads;
4. 说明书以 $1 \times 10^7$ 个细胞量举例, 如果分选更多细胞, 则按比例增加试剂用量。例如分选 $5 \times 10^7$  cells, 则在500  $\mu\text{L}$ 细胞悬液中加入10  $\mu\text{L}$  Biotin-Antibody Mix和100  $\mu\text{L}$  Streptavidin-Beads;
5. 本产品需与磁性分离器配套使用;
6. 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CD4 $^{+}$ T细胞, 分选前后的细胞用FITC anti-mouse CD4 抗体 (克隆号GK1.5) 标记后进行流式细胞分析, 分选前后的CD4 $^{+}$ T细胞纯度分别为20.3%和98.8%。