

人CD4磁珠分选试剂(51-01-0001)

[组分] CD4 磁珠，人：与人 CD4 单抗偶联的磁珠(同型：小鼠 IgG1)。

[规格] 2mL，可分选 10^9 总细胞数，多达 100 次分选。

[保存形式] 保存在含有稳定剂和 0.05%叠氮钠的溶液中。

[储存条件] 在 2-8°C 条件下避光保存，请勿冷冻。有效期见试剂外标签。

[分选原理]

首先，用 CD4 磁珠对细胞进行磁性标记。然后，将细胞悬液加载到分选柱上，该柱放置在含分选器的磁场中。磁性标记的 CD4+细胞被保留在柱内。未标记的细胞贯穿其中，因此，这一细胞部分的细胞被去除。将分选柱从磁场中移除之后，洗脱磁性标记的 CD4+细胞作为阳性选择的细胞。

[试剂和设备]

● 缓冲液：含有 pH7.2、0.5%BSA 和 2mM EDTA 的溶液。保持缓冲液冷却状态(2-8°C)。

▲注：EDTA 可以被其他取代，如抗凝柠檬酸葡萄糖配方 A(ACD-A)或柠檬酸磷酸葡萄糖(CPD)。BSA 可以被其他蛋白质取代，如人血清白蛋白、人血清或胎牛血清。不建议使用含有钙离子或镁离子的缓冲液或培养基。

● 分选柱和分选器：CD4+细胞可通过 xM、xL 柱(阳性选择)进行富集。也可以使用自动分选器进行去除。

● (可选)用于流式细胞术分析的荧光偶联 CD4 抗体。

● (可选)PI(碘化丙啶)或 7-AAD 用于流式细胞术排除死亡细胞。

● (可选) 预分离过滤器用于去除细胞团块。

[1. 样本制备]

当处理抗凝的外周血液时，应通过密度梯度离心法分离外周血单核细胞(PBMC)。

▲注：密度梯度分离后去除血小板：将细胞颗粒重新悬浮在缓冲液中，在 20°C 下以 200xg 离心 10-15 分钟，小心去除上清液。重复洗涤步骤。

在处理组织时，用标准的制备方法制备单细胞悬浮液。

▲注：死亡细胞可能非特异性地结合到磁珠上。要去除死细胞，我们建议使用密度梯度离心法或死细胞去除试剂盒。

[2. 磁性标记]

▲过程操作速度要快，试剂需提前预冷。可以减少非特异性细胞标记。

▲磁性标记的体积最多可达 10^7 个细胞。少于 10^7 个细胞时，请使用标示的相同试剂体积。当处理更多的细胞时，相应地放大所有试剂体积 (例如，对于 2×10^7 个总细胞，使用标示试剂体积的两倍)。

▲为了获得最佳性能，在磁分选之前获得单细胞悬浮液是很重要的。通过预分离过滤器去除可能堵塞分选柱的细胞团块。

1. 细胞计数。

2. 300g 离心 10min，去除上清。

3. 每 10^7 细胞，用 80 μ L 缓冲液重悬。

4. 每 10^7 细胞，用 20 μ L CD4 磁珠混匀。

5. (2-8) °C 冰箱避光孵育 15min (如果是在冰上孵育，需要增加孵育时间；如果是常温孵育，会增加非特异结合)。

6. (可选)加入染色抗体，在 2-8°C 避光孵育 5 分钟。

7. 每 10^7 细胞，加入 1-2 mL 缓冲液洗涤，300g 离心 10min，弃上清。

8. 用 500 μ L 缓冲液重悬细胞。

▲处理更多细胞数时，请相应地增加缓冲液用量。

[3. 磁性分选]

▲ 根据总细胞数和标记细胞数选择合适的分选柱和分选器。

1. 将分选柱放置在分选器的磁场中。

2. 将分选柱中加入适量缓冲液，充分湿润分选柱:

xM: 500 μ L xL: 3 mL

3. 将细胞悬液加到分选柱中。

4. 结合磁珠的细胞会被吸附到分选柱上，没有结合的细胞会顺着液体流下来。加适量的缓冲液，待液体全部流尽，再加入适量缓冲液，一共洗 3 次。收集总流出物。这是未标记的细胞。

xM: 3 \times 500 μ L xL: 3 \times 3 mL

5. 将分选柱从分选器中取出，并将其放在合适的收集管上。

6. 加适量的缓冲液到分选柱中，迅速用塞子推下，得到就是目的细胞。

xM: 1 mL xL: 5 mL

7. (可选)为了提高标记细胞的纯度，洗脱部分可以在第二个 xM 或 xL 柱上富集。使用新的分选柱重复步骤 1 至 6 中描述的磁选过程。