

## CD4+CD25+调节性T细胞分选试剂盒，小鼠(92-01-0062)

### [组分]

1 mL CD4+CD25+调节性 T 细胞生物素抗体混合物，小鼠：生物素偶联的抗 CD8a、CD11b、CD45R、CD49b 和 Ter-119 单抗的混合物。

2 mL 抗生物素磁珠：与单克隆抗生物素抗体（同型：小鼠 IgG1）偶联的磁珠。

0.2 mL CD25-PE，小鼠：与 PE 偶联的抗鼠 CD25 单抗（同型：大鼠 IgM）。

1 mL 抗 PE 磁珠：与 PE 单抗偶联的磁珠（同型：小鼠 IgG1）。

[规格] 可分选  $10^9$  总细胞数，多达 100 次分选。

[保存形式] 所有组分储存在含有稳定剂和 0.05% 叠氮化钠的缓冲液中。

[储存条件] 2-8 °C 避光保存，请勿冷冻。有效期见试剂外标签。

### [分选原理]

CD4+CD25+调节性 T 细胞的分选分两步进行。首先，用生物素偶联的抗体混合物作为一级标记试剂，将与磁珠偶联的抗生物素单抗作为二级标记试剂，间接磁性标记非 CD4+T 细胞。在这两个步骤之间不需要洗涤。同时，细胞用 CD25-PE 标记，随后通过置于分选器中的分选柱进行分选，将磁性标记的非 CD4+细胞保留在分选柱中，而未标记的 CD4+T 细胞则流出。

在第二步中，用抗 PE 磁珠对 CD25-PE 标记的细胞进行磁性标记，并通过将其放置在分选器的磁场中的分选柱上分离，从预富集的 CD4+细胞中进行正选。磁性标记的 CD4+CD25+细胞保留在柱中，而未标记的 CD4+CD25-细胞则穿过分选柱并可作为应答 T 细胞用于抑制测定。

在从磁场中移除该分选柱后，磁性标记的 CD4+CD25+细胞可以作为阳性选择的细胞部分被洗脱。为了提高纯度，必须在第二个分选柱分离含有 CD4+CD25+细胞的阳性选择细胞部分。

### [背景信息]

为了从小鼠脾或淋巴结的单个细胞悬液中分离出小鼠的 CD4+CD25+调节性 T 细胞，在分离过程中不需要离心洗涤步骤，而开发了一种 CD4+CD25+调节性 T 细胞分选试剂盒。

体内和体外研究表明，CD4+CD25+免疫调节性 T 细胞能够主动抑制针对自体抗原和外来抗原的免疫反应。CD25 是 IL-2R 的 $\alpha$ 链，也表达在活化的 CD8+T 细胞、树突状细胞和 B 细胞上。

该试剂盒包含一组针对 CD8、CD11b、CD45R、CD49b、Ter-119 的谱系特异性生物素偶联抗体混合物和用于去除非 CD4+T 细胞的抗生物素磁珠，以及用于随后阳性选择 CD4+CD25+调节性 T 细胞的 CD25-PE 和抗 PE 磁珠。

### [试剂和仪器要求]

● 缓冲液： 配制含有 pH7.2 PBS、0.5% 牛血清白蛋白（BSA）和 2mMEDTA 的溶液。将缓冲液置于 2-8 °C。使用前对缓冲液进行脱气处理，因为空气气泡可能会堵塞分选柱。

▲ 注：EDTA 可由其他补充剂替代，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 可以用其他蛋白质代替，例如小鼠血清白蛋白、小鼠血清或胎牛血清。不建议使用含有  $\text{Ca}^{2+}$  或  $\text{Mg}^{2+}$  的缓冲液或培养基。

- 分选柱和分选器：非 CD4+细胞的去除可以在 LD 柱上进行。随后的 CD4+CD25+T 细胞阳性选择可以在两个 xM 柱上进行。
- (可选) 荧光偶联的抗体用于流式分析。
- (可选) PI 或 7-AAD 可以用于流式分析中排除死细胞。
- (可选) 死细胞清除试剂盒用于死细胞的清除。
- (可选) 预分离过滤器去除细胞团块。

## [步骤]

### 一、样本准备

在处理脾脏或淋巴组织时，使用标准方法制备单细胞悬液。

▲注意：该试剂盒未针对从血液和胸腺中分离的调节性 T 细胞进行优化。

▲注意：不需要红细胞裂解或密度梯度离心，因为 CD4+CD25+ T 细胞生物素抗体混合物含有抗 Ter-119 抗体。

### 二、磁珠标记

▲快速工作，保持细胞低温，并使用预冷溶液，可以减少细胞的非特异性标记。

▲下面给出的磁珠标记规模为  $10^7$  个细胞总量。当处理少于  $10^7$  个细胞时，使用与指示相同的试剂体积。当处理较高的细胞数时，相应地扩大所有试剂体积和总体积(例如，对于  $2 \times 10^7$  总细胞，使用所有指示试剂体积和总体积的两倍体积)。

▲为了获得最佳性能，在磁标记之前获得单细胞悬浮液是很重要的。将细胞通过 30  $\mu\text{m}$  尼龙网，去除可能堵塞分选柱的细胞团块。使用前用缓冲液湿润过滤器。

▲在冰上工作可能需要增加孵育时间。较高的温度和/或较长的孵育时间可能导致非特异性细胞标记。

1. 细胞计数。
2. 300×g 离心 10 分钟。去除上清。
3. 每  $10^7$  个细胞总量使用 40  $\mu$ L 缓冲液重悬。
4. 每  $10^7$  个细胞总量添加 10  $\mu$ L CD4+CD25+调节性 T 细胞生物素抗体混合物。
5. 混匀，2-8 °C 孵育 10 分钟。
6. 每  $10^7$  个细胞总量添加 38  $\mu$ L 缓冲液和 20  $\mu$ L 抗生物素磁珠和 2  $\mu$ L CD25-PE 抗体。

▲注意：由于分离过程，CD4+CD25+靶细胞被 CD25-PE 染色，并且可以通过流式细胞仪检测。

7. 混匀，2-8 °C 孵育 15 分钟。
8. 保持至少 500  $\mu$ L 的总体积。如有必要，向细胞悬液中添加缓冲液。

### 三、细胞分选：去除非 CD4+细胞

▲始终是等到分选柱储液器排空后再进行下一步操作。

使用 LD 分选柱进行分选

1. 将 LD 分选柱置于合适的分选器中。
2. 用 2mL 缓冲液润洗分选柱。
3. 将细胞悬液转移至分选柱中。
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 1mL 缓冲液，待液体全部流尽，再加入 1mL 缓冲液。收集总流出物，这是未标记 CD4+的细胞。

5. 进行 CD25+T 细胞的磁性标记。

#### 四、磁性标记：CD25+细胞

下面给出的磁珠标记规模为  $10^7$  个细胞总量。当处理较高的细胞数时，相应地扩大所有试剂体积和总体积。

1.  $300\times g$  离心 5 分钟。去除上清。
2. 每  $10^7$  个细胞总量使用 90  $\mu\text{L}$  缓冲液重悬。
3. 每  $10^7$  个细胞总量添加 10  $\mu\text{L}$  抗 PE 磁珠。
4. 混匀，2–8  $^{\circ}\text{C}$  孵育 15 分钟。
5. 进行细胞分选步骤。

▲ 注意：磁力分选至少 500  $\mu\text{L}$  的总体积。如有必要，向细胞悬液中添加缓冲液。

#### 五、细胞分选：CD4+CD25+调节性 T 细胞的阳性选择

▲为了提高细胞的纯度，洗脱的部分可以在第二个分选柱上富集。

1. 将 xM 分选柱置于相对应的分选器中。
2. 用 500 $\mu\text{L}$  的缓冲液润洗分选柱：
3. 将细胞悬液转移至分选柱中，收集含有 CD4+CD25-细胞的流出液。
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。加入 500 $\mu\text{L}$  的缓冲液，待液体全部流尽，再加入 500 $\mu\text{L}$  缓冲液，一共洗 2 次。收集总流出物，这是未标记的细胞。
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 1mL 的缓冲液到分选柱中，迅速用塞子推下，得到就是目的细胞。

▲ 注意：若要进行第二次分选，可直接将细胞从第一个分选柱洗脱到第二个分选柱中，不需要使用收集管。

7.使用新的分选柱重复步骤 1 至 6 中描述的磁分选过程。