

## TCR $\gamma$ / $\delta$ +T细胞分选试剂盒，小鼠(92-01-0081)

**[组分]** 1 mL 非 T 细胞去除试剂混合物，小鼠：与小鼠 CD45R (B220；同种型：大鼠 IgG2a) 和 CD11b (Mac-1 $\alpha$ -链；同种型：大鼠 IgG2b) 的单克隆抗体偶联的磁珠以及生物素偶联的小鼠 TCR $\gamma$ / $\delta$  的单克隆抗体（同种型：仓鼠 IgG2）混合物。

1ml 抗生物素磁珠：与抗生物素单抗偶联的磁珠(同型：小鼠 IgG1)。

**[规格]** 可分选  $2 \times 10^9$  总细胞数。

**[保存形式]** 去除试剂混合物保存在含有稳定剂和 0.05%叠氮钠的溶液中。

抗生物素磁珠保存在 0.05%叠氮钠的溶液中。

**[储存条件]** 在 2–8°C 条件下避光保存，请勿冻存。有效期见试剂外标签。

### [试剂和设备]

- 缓冲液：含有 pH7.2、0.5%BSA 和 2mM EDTA 的溶液。不建议使用含有钙离子或镁离子的缓冲液。
- 选择合适的分选柱和分选器，在 LD 柱上去除非 TCR $\gamma$ / $\delta$ + T 细胞，然后在两个 xM 柱上进行 TCR $\gamma$ / $\delta$ + T 细胞的阳性选择，也可以使用自动分选器进行操作。
- (可选) 预分离过滤器用于去除细胞团块。
- (可选)用于流式细胞术分析的荧光标记抗体。
- (可选)碘化丙啶溶液或 7-AAD 用于流式细胞术排除死亡细胞。

### [1.样本制备]

使用标准方法从淋巴器官制备单细胞悬浮液。

▲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. 磁性标记非 T 细胞]

▲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  $10^8$  个细胞。少于  $10^8$  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  $2 \times 10^8$  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. 白细胞计数。
2. 离心，300g，10min，去除上清。
3. 每  $10^8$  细胞，用 450 $\mu$ L 缓冲液重悬。
4. 每  $10^8$  细胞，用 50  $\mu$ L 非 T 细胞去除试剂混合物 (小鼠) 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. 添加 10-20 倍标记体积的缓冲液洗涤细胞，300 $\times$ g 离心 10 分钟。完全吸去上清液。
7. 加 500 $\mu$ L 缓冲液重悬细胞。
8. 进行磁分选。

## [3. 磁性分选去除非 T 细胞]

[ xD 柱去除 ]

1. 将 xD 分选柱置于合适的分选器的磁场中。
2. 用 2mL 缓冲液冲洗分选柱。
3. 将细胞悬浮液转移到分选柱中。
4. 收集未标记的细胞，用  $2 \times 1$  mL 缓冲液清洗分选柱。分选柱储液器排空后，依次加入缓冲液进行清洗。收集全部流出物。这包含未标记的预富集 T 细胞部分。
5. 继续分离 TCR $\gamma$ / $\delta$ + T 细胞。

## [4. TCR $\gamma$ / $\delta$ + T 细胞的磁性标记]

▲磁性标记的体积最多可达  $10^8$  个细胞。少于  $10^8$  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  $2 \times 10^8$  个总细胞，使用标示试剂体积的两倍)。

1. 离心，300g，10min，去除上清。
2. 每  $10^8$  细胞，用 450 $\mu$ L 缓冲液重悬。
3. 每  $10^8$  细胞，用 50  $\mu$ L 抗生物素磁珠混匀。
4. 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）。
5. 添加 10-20 倍标记体积的缓冲液洗涤细胞，300 $\times$ g 离心 10 分钟。完全吸去上清液。
6. 加 500 $\mu$ L 缓冲液重悬细胞。
7. 进行磁分选。

#### [5. 磁性分选 TCR $\gamma$ / $\delta$ + T 细胞]

1. 将 xM 分选柱放置在分选器的磁场中。
2. 在分选柱中加入 500  $\mu$ L 缓冲液，充分湿润分选柱：
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 500  $\mu$ L 缓冲液，待液体全部流尽，再加入适量缓冲液，一共洗 3 次。
5. 从分选器中取出色谱柱并将其放置在合适的收集管上。
6. 加 1 mL 缓冲液在分选柱上。用力推动的柱塞，立即冲洗带有磁性标记的 TCR $\gamma$ / $\delta$ + T 细胞的部分。
7. 使用新分选柱重复步骤 1 至 6 中所述的磁力分选程序。