

## CD3 $\epsilon$ 分选磁珠试剂盒，小鼠(92-01-0112)

**[组分]** 1mL CD3 $\epsilon$ -生物素，小鼠：与生物素偶联的小鼠 CD3 $\epsilon$  单抗(同型：仓鼠 IgG1 型)。

2mL 抗生物素抗体磁珠：与抗生物素单抗偶联的磁珠(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]** 所有组分均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，用生物素标记 CD3 $\epsilon$ +细胞。随后，用抗生物素磁珠对细胞进行磁性标记。然后，将细胞悬液加到分选柱上，该柱放置在分选器的磁场中。磁性标记的 CD3 $\epsilon$ +细胞保留在柱内，未标记的细胞贯穿整个柱子。

### [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(4–8°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，如小鼠血清白蛋白、小鼠血清或胎牛血清。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：使用 LD 柱可以去除 CD3 $\epsilon$ +细胞，也可以使用自动分选器进行操作。

● (可选)用于流式细胞术分析的荧光偶联抗体，例如 CD45R(B220)-FITC、CD4-APC、CD8a-FITC 和 Anti-Biotin-PE 用于小鼠 T 细胞的分析。

● (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) 死细胞去除试剂盒用于去除死细胞。

● (可选) 预分离过滤器用于去除细胞团块。

## [1. 样本制备]

在处理淋巴器官、非淋巴组织或外周血时，可使用手动方法或组织解离器制备单细胞悬液。

▲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  $2 \times 10^7$  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。

▲建议孵育温度为  $2-8^{\circ}\text{C}$ 。在冰上工作可能需要增加孵育时间。更高的温度和/或更长的孵育时间可能会导致非特异性细胞标记。

1. 细胞计数。
2.  $300\text{g}$ ，离心  $10\text{min}$ ，去除上清。
3. 每  $10^7$  细胞，用  $100\ \mu\text{L}$  缓冲液重悬。
4. 每  $10^7$  细胞，用  $10\ \mu\text{L}$   $\text{CD}3\epsilon$ -生物素混匀。
5. 混匀， $(2-8)^{\circ}\text{C}$  冰箱避光孵育  $10\text{min}$ 。
6. 每  $10^7$  细胞加入  $1-2\text{mL}$  缓冲液洗涤细胞， $300 \times \text{g}$  离心机  $10$  分钟。完全吸去上清。
7. 每  $10^7$  细胞，用  $80\ \mu\text{L}$  缓冲液重悬。
8. 每  $10^7$  细胞，加入  $20\ \mu\text{L}$  抗生物素磁珠。
9. 混合均匀，在冰箱( $2-8^{\circ}\text{C}$ )孵育  $15$  分钟。
10. (可选)加入染色抗体，例如  $10\ \mu\text{L}$  的抗生物素-PE 或抗生物素-APC，避光( $2-8^{\circ}\text{C}$ )孵育  $5$  分钟。
11. 每  $10^7$  细胞加入  $1-2\text{mL}$  缓冲液洗涤细胞， $300 \times \text{g}$  离心机  $10$  分钟。完全吸去上清。
12. 最后将最多  $1.25 \times 10^8$  细胞重悬在  $500\ \mu\text{L}$  缓冲液中。

▲处理更多细胞数时，请相应地增加缓冲液用量。

### [3. 手动磁性分选]

▲根据总细胞数和 CD3ε+细胞数选择合适的分选柱和分选器。

▲始终等到分选柱储液器排空后再进行下一步操作。

使用 LD 分选柱进行细胞分选

1. 将分选柱置于相对应的分选器中。
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. 用 2mL 缓冲液清洗分选柱，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。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。

### [4. 自动磁性分选]

▲如何使用自动分选仪，请参阅用户手册。

▲所有缓冲温度应为 $\geq 10^{\circ}\text{C}$ 。

▲程序的选择取决于分选策略、磁性标记的强度和磁性标记细胞的效率。以下程序是小鼠脾细胞的分选建议：

1. 准备好仪器并做好前期准备。
2. 放置包含样品的试管，并提供收集标记和未标记细胞的试管。将样品管放置在管架的 A 排中，将采集管放置在 B 和 C 排中。
3. 选择以下程序：去除：“Depl05”，收集管架 B 里的未标记细胞。