



CD3+CD56+NKT细胞分选试剂盒，人(92-01-0286)

[组分]

2 mL 人 CD3 + CD56 + NKT 生物素抗体混合物：针对 CD3 + CD56 + NKT 细胞不表达的抗原的生物素结合单克隆抗人抗体混合物。

2 mL 抗生物素磁珠：与单克隆抗生物素抗体（同种型：小鼠 IgG1）结合的磁珠。

2 mL CD56 磁珠：与单克隆抗 CD56 抗体（克隆 AF12-7H3；同种型：小鼠 IgG1）结合的磁珠。

[规格] 可分选 2×10^9 个细胞总量，多达 20 次。

[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]

CD3 + CD56 + NKT 细胞分选试剂盒是一种分两步从人类外周血单个核细胞（PBMC）中分离 CD3 + CD56 + NKT 细胞的磁性标记系统。第一步，使用生物素结合抗体混合物和抗生物素磁珠对 NK 细胞和单核细胞进行间接磁性标记。标记的细胞随后通过分选柱被去除。

第二步，用 CD56 分选磁珠直接标记 CD3 + CD56 + NKT 细胞，并通过阳性选择从预富集的 NKT 细胞部分中分离出来。磁性标记的 CD3 + CD56 + NKT 细胞保留在分选柱上，并在分选柱脱离磁场后被洗脱。

[背景信息]

自然杀伤（NK）T 细胞是具有 NK 细胞特性的 T 细胞亚群。NKT 细胞可通过与抗原接触或受到细胞因子（如 IL-12）的刺激而释放大量细胞因子并发挥细胞毒性作用。NKT 细胞是先天性免疫系统的重要组成部分，对自身免疫性疾病的发展有影响。它们还参与肿瘤免疫学以及对病毒、细菌、真菌和寄生虫病原体的免疫。

[试剂和仪器要求]

- 缓冲液： 配制含有 pH 7.2 PBS、0.5% 牛血清白蛋白（BSA）和 2 mM EDTA 的溶液。将缓冲液置于 4-8 °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，例如人血清白蛋白、人血清或胎牛血清。不建议使用含有 Ca^{2+} 或 Mg^{2+} 的缓冲液或培养基。
- 分选柱和分选器。
- 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

在处理抗凝外周血、白膜层时，应使用密度梯度离心法分离外周血单个核细胞（PBMC），例如使用 Ficoll-Paque™ 方法。

▲注：在密度梯度分离后除去血小板，将细胞重悬于缓冲液中，在 $200\times g$ 下 20°C 离心 10-15 分钟。小心抽吸上清。重复洗涤步骤。

处理组织时，用标准制备方法制备单细胞悬浮液。

▲注：死细胞可能与磁珠非特异性结合。为了去除死细胞，我们建议使用密度梯度离心或死细胞去除试剂盒。

二、磁珠标记非 CD3 + CD56 + NKT 细胞

▲ 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 10^8 个细胞总量。当处理少于 10^8 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 2×10^8 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 $30\text{ }\mu\text{m}$ 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. $300\times g$ 离心 10 分钟。去除上清。

3. 每 10^8 个细胞总量使用 $400\text{ }\mu\text{L}$ 缓冲液重悬。

4. 每 10^8 个细胞总量添加 $100\text{ }\mu\text{L}$ CD3 + CD56 + NKT 生物素抗体混合物。

5. 混匀，4-8 °C 孵育 10 分钟。
 6. 加入 5 - 10 mL 缓冲液洗涤细胞，300×g 离心 10 分钟，去上清。
 7. 每 10^8 个细胞用 400 μ L 缓冲液重悬。
 8. 每 10^8 个细胞用 100 μ L 抗生物素磁珠重悬。
 9. 混匀，4-8 °C 孵育 15 分钟。
 10. 加入 5 - 10 mL 缓冲液洗涤细胞，300×g 离心 10 分钟，去上清。
 11. 用 500 μ L 缓冲液重悬最多 10^8 个细胞。
- ▲ 注：细胞数量增多需相应地增加缓冲液的体积。
12. 进行细胞分选步骤。

三、细胞分选：去除非 CD3 + CD56 + NKT 细胞

使用 LD 分选柱进行去除

1. 将 LD 分选柱放入合适的分选器磁场中。
2. 用 2 mL 缓冲液冲洗分选柱。
3. 将细胞悬浮液装载到分选柱中。
4. 收集通过的未标记细胞，用 2×1 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。收集总流出液。其中包含未标记的预富集 CD3 + CD56 + NKT 细胞部分。
5. 继续分离 CD3 + CD56 + NKT 细胞。

四、CD3 + CD56 + NKT 细胞的磁性标记

下面给出的磁性标记体积适用于初始细胞数不超过 10^8 的细胞。如果初始细胞数较多，可相应增加体积。

1. 将细胞以 $300\times g$ 离心 10 分钟。完全吸出上清液。
2. 每 10^8 个初始细胞用 400 μL 缓冲液重悬细胞颗粒。
3. 每 10^8 初始细胞加入 100 μL CD56 分选磁珠。
4. 混匀并孵育 15 分钟（4-8 $^{\circ}\text{C}$ ）。
5. 加入 5-10 mL 缓冲液清洗细胞， $300\times g$ 离心 10 分钟。完全吸出上清液。
6. 用 500 μL 缓冲液重悬 10^8 个细胞。
7. 进行细胞分选。

五、细胞分选：CD3 + CD56 + NKT 细胞阳性分选

xM 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 500 μL 的缓冲液润洗分选柱：
3. 将细胞悬液转移至分选柱中。收集流出的未标记细胞。
4. 加适量缓冲液洗脱，待液体全部流尽，再加入 500 μL 缓冲液，一共洗 3 次。收集总流出物和第三步流出物混合。
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 1 mL 的缓冲液到分选柱中，迅速用塞子推下，得到就是磁性标记的细胞。



FOCUS ON CELL THERAPY

7. 为了提高 iNKT+细胞的纯度，洗脱的部分可以在第二个 xM 或 xL 柱上富集。用新的分选柱重复步骤 1 至 6 中描述的磁分选过程。