

CD3分选磁珠，人，冻干粉(92-01-0138)

[组分]

1 瓶 人冻干 CD3 磁珠：与抗人 CD3 单克隆抗体（同种型：小鼠 IgG2a）偶联的微珠。

2 mL 复溶缓冲液

[规格] 可分选 10^9 个细胞总量。

[保存形式] 冻干粉。复溶缓冲液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，请勿冻存。有效期见试剂外标签。

[分选原理]

首先，用 CD3 磁珠对 CD3+细胞进行磁性标记。然后，将细胞悬液装入置于分选器磁场的柱中。磁性标记的 CD3+细胞被保留在柱中，未标记的细胞顺着分选柱流出。将柱从磁场中移出后，磁性标记的 CD3+ 细胞可作为正选细胞部分被洗脱出来。

[背景信息]

CD3 在所有 T 细胞上表达，并与 T 细胞受体相关。人类外周血淋巴细胞的 70-80%和胸腺细胞的 65-85%是 CD3+。CD3 磁珠识别的表位位于 CD3 ϵ 链上。

[试剂和仪器要求]

● 缓冲液：配制含有 pH7.2PBS、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。

● 分选柱和分离器：CD3 阳性细胞可以用 xM、xL 分选柱富集。强烈表达 CD3 抗原的细胞也可以用 xM、xL 分选柱去除。

● (可选) 荧光偶联的 CD3 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、磁珠复溶

向小瓶中加入所有复溶缓冲液，溶解冻干磁珠。用移液管吹吸混合，直至重新悬浮。溶解后的磁珠在 2-8 °C 下可稳定保存 4 个月。在小瓶标签上写上复溶后的新有效期。

二、样本准备

在处理抗凝外周血或白膜层时，应使用密度梯度离心法分离外周血单个核细胞 (PBMC)。

▲ 注：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。

当处理组织或溶血时，使用标准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。

三、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 2×10^7 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. $300 \times g$ 离心 10 分钟。去除上清。
3. 每 10^7 个细胞总量使用 $80\ \mu\text{L}$ 缓冲液重悬。
4. 每 10^7 个细胞总量添加 $20\ \mu\text{L}$ CD3 磁珠。
5. 混匀， $2-8\ ^\circ\text{C}$ 孵育 15 分钟。
6. (可选) 添加染色抗体，例如： $10\ \mu\text{L}$ CD3-FITC $2-8\ ^\circ\text{C}$ 避光孵育 5 分钟。
7. 每 10^7 个细胞加入 $1-2\ \text{mL}$ 缓冲液洗涤细胞， $300 \times g$ 离心 10 分钟，去上清。
8. 用 $500\ \mu\text{L}$ 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。

9. 进行细胞分选步骤。

四、细胞分选

▲ 根据总细胞数和 CD3⁺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空后再进行下一步操作。

xM 或 xL 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. 用适当体积的缓冲液润洗分选柱：

xM: 500 μ L

xL: 3 mL

3. 将细胞悬液转移至分选柱中。收集包含未标记细胞的流出液。

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，和第 3 步的流出液混合。

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，得到就是磁性标记的细胞。

xM: 1 mL

xL: 5 mL