

CD4分选磁珠，人，冻干粉(92-01-0139)

[组分]

1 瓶 人冻干 CD4 磁珠：与抗人 CD4 单克隆抗体（同种型：小鼠 IgG1）偶联的磁珠。

2 mL 复原缓冲液。

[规格] 可分选 10^9 个细胞总量。

[保存形式] 冻干粉。复原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 CD4 磁珠对 CD4+ 细胞进行磁性标记。然后，将细胞悬浮液装入置于分选器磁场的分选柱中。磁性标记的 CD4+ 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，磁性保留的 CD4+ 细胞可作为正选细胞部分被洗脱出来。

[背景信息]

CD4 磁珠是为根据 CD4 抗原的表达来分选人源细胞而开发的。CD4 是一种 55 kDa 蛋白，在胸腺和外周血中的 T 辅助细胞上高度表达。CD4 是通过 CD4 + T 辅助细胞上的 TCR 异二聚体识别 MHC II 类/肽复合物的辅助分子。CD4 在 T 辅助细胞上表达，在单核细胞和树突状细胞上表达较低。CD4 分子是人类免疫缺陷病毒的受体。

[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 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。
- 分选柱和分选器：CD4 阳性细胞可以用 xM、xL 分选柱富集。强烈表达 CD4 抗原的细胞也可以用 xM、xL 分选柱去除。
- （可选）荧光偶联的 CD4 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、磁珠溶解

向小瓶中加入所有复原缓冲液，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 9 个月。在小瓶标签上写上溶解后的新有效期。

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: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。

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。

为了分离高纯度的 T 辅助细胞,在富集 CD4^{+} T 细胞之前,应使用 CD14 磁珠去除单核细胞。

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 2×10^7 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 $30\text{ }\mu\text{m}$ 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 10^7 个细胞总量使用 $80\text{ }\mu\text{L}$ 缓冲液重悬。
4. 每 10^7 个细胞总量添加 $20\text{ }\mu\text{L}$ CD4 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 μ L CD4-FITC 2-8 $^{\circ}$ C 避光孵育 5 分钟。
 7. 每 10^7 个细胞加入 1-2 mL 缓冲液洗涤细胞, 300 $\times$ g 离心 10 分钟, 去上清。
 8. 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。
9. 进行细胞分选步骤。

四、细胞分选

- ▲ 根据总细胞数和 CD4⁺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。

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



7. (可选) 为了提高 CD4⁺ 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。