

## iNKT细胞分选磁珠，人(92-01-0287)

### [组分]

**人抗 iNKT 磁珠：**与抗人 Va24-Jα18 单克隆抗体（同型：小鼠 IgG1）偶联的磁珠。

**[规格]** 2 mL，可分选  $2 \times 10^9$  个细胞总量。

**[保存形式]** iNKT 磁珠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]

首先，用 iNKT 磁珠对 iNKT+ 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 iNKT+ 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 iNKT+ 细胞可作为正选细胞部分被洗脱出来。为了提高纯度，含有 iNKT 细胞的阳选细胞部分在第二个分选柱上分离。

### [背景信息]

自然杀伤 T (NKT) 细胞是一种独特的淋巴细胞群，共同表达 T 细胞和 NK 细胞表面标记。iNKT 细胞代表不同的淋巴细胞群，其特征在于表达不变的 T 细胞受体α链和某些 TCRβ链（Va24-Jα18 与 Vβ11 组合）。iNKT 细胞参与免疫调节过程，如耐受性，宿主防御和肿瘤监测。

根据 TCR α 链 Va24-Jα18 的表达，开发了用于分离人细胞的抗 iNKT 磁珠。

## [试剂和仪器要求]

- 缓冲液： 配制含有 pH7.2 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  $\text{Ca}^{2+}$  或  $\text{Mg}^{2+}$  的缓冲液或培养基。
- 分选柱和分选器： iNKT 阳性细胞可以用 xM、 xL 分选柱富集。
- 荧光偶联的 iNKT 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、白膜层或脐带血时，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×g 下 20°C 离心 10-15 分钟。

小心抽吸上清。重复洗涤步骤。

▲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

▲ 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  $2 \times 10^8$  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  $30 \mu\text{m}$  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  $400 \mu\text{L}$  缓冲液重悬。

4. 每  $10^8$  个细胞总量添加  $100 \mu\text{L}$  iNKT 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： $50 \mu\text{L}$  抗 iNKT-PE  $2-8^\circ\text{C}$  避光孵育 5 分钟。

7. 每  $10^8$  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。

## 三、细胞分选

▲ 根据总细胞数和 iNKT+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  $\mu$ L

xL: 3 mL

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，再加入适量缓冲液，一共洗 3 次。收集总流出物和第三步流出物混合。

xM: 3 $\times$ 500  $\mu$ 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. 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。