

CD4+CD25+CD127^{dim/-}Treg细胞分选试剂盒II，人(92-01-0111)

[组分]

1 mL CD4+CD25+CD127^{dim/-}Treg 细胞生物素抗体混合物，人：生物素偶联的抗 CD8、CD19、CD123 和 CD127 单抗的混合物。

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

1 mL CD25 磁珠 II，人：与抗 CD25 单抗偶联的磁珠（同种型：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]

CD4+CD25+CD127^{dim/-}调节性 T 细胞的分选分两步进行。首先，用生物素偶联的抗体混合物作为一级标记试剂，将与磁珠偶联的抗生物素单抗作为二级标记试剂，间接磁性标记非 CD4 和 CD127 高表达细胞。在这两个步骤之间和之后，不需要洗涤步骤。标记的细胞随后通过在分选柱上的分选而被去除，该分选柱被放置在分选器的磁场中。

在第二步中，用 CD25 磁珠 II 直接标记 CD4+CD25+CD127^{dim/-}调节性 T 细胞，并通过将其放置在分选器的磁场中的分选柱上分选，通过阳性选择从预富集的 CD4+T 细胞部分中分选。

在从磁场中移除该分选柱后，磁性标记的 CD4+CD25+ CD127^{dim/-}调节性 T 细胞可以作为阳性选择的细胞部分被洗脱。为了提高纯度，含有 CD4+CD25+ CD127^{dim/-}调节性 T 细胞的阳性选择细胞部分可通过第二个分选柱分离。

[背景信息]

调节性 CD4+T 细胞是通过各种机制中和其他免疫细胞的抑制性细胞。它们的特征标记是转录因子 FoxP3。CD4+CD25+调节性 T 细胞最初是在小鼠身上发现的，但在人类中也发现了具有相同表型的群体。CD25 是白介素 2 受体 α 链，不仅表达于调节性 T 细胞，也表达于活化的效应性 T 细胞。

CD127 是 IL-7 受体的 α 链，在大多数成熟 T 细胞上表达，并在其增殖和分化中发挥重要作用。但在调节性 T 细胞上 CD127 缺失，其表达与 FoxP3 表达呈负相关，因此，CD127 可以作为区分人类调节性 T 细胞和活化 T 细胞的额外标记物。

[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 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 Ca²⁺ 或 Mg²⁺ 的缓冲液或培养基。

● 分选柱和分选器：非 CD4+和 CD127 高表达细胞的去除可以在 LD 柱上进行。随后的 CD4+CD25+ CD127^{dim/-}调节性 T 细胞阳性选择可以在两个 xM 柱上进行。

- （可选）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

当处理抗凝外周血或白膜层时，应通过密度梯度离心法分离外周血单个核细胞(PBMC)。

▲注意：在密度梯度分离后取出血小板，请将细胞颗粒重新悬浮在缓冲液中，并在 20°C 下以 200×g 的速度离心 10—15 分钟。仔细吸去上清，重复洗涤步骤。

在处理组织时，使用标准方法制备单细胞悬液。

▲死细胞可能与磁珠非特异性结合。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。

二、磁珠标记：非 CD4⁺和 CD127 高表达细胞

▲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 10^7 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 μm 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×g 离心 10 分钟。去除上清。
3. 每 10^7 个细胞总量使用 40 μL 缓冲液重悬。
4. 每 10^7 个细胞总量添加 10 μL CD4+CD25+CD127^{dim/-}Treg 细胞生物素抗体混合物。
5. 混匀，2-8 °C 孵育 5 分钟。
6. 每 10^7 个细胞总量添加 30 μL 缓冲液和 20 μL 抗生物素磁珠 II。
7. 混匀，2-8 °C 孵育 10 分钟。
8. 保持至少 500 μL 的总体积。

▲ 注：500 μL 缓冲液重悬最多 10^8 个细胞，细胞数量增多需相应地增加缓冲液的体积。

三、细胞分选：去除非 CD4+和 CD127 高表达细胞

▲ 根据总细胞数和 CD4+CD25+CD127^{dim/-}细胞数选择合适的分选柱和分选器。

▲始终是等到分选柱储液器排空后再进行下一步操作。

使用 LD 分选柱进行分选

1. 将 LD 分选柱置于合适的分选器中。
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. 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 1mL 缓冲液，待液体全部流尽，再加入 1mL 缓冲液。收集总流出物，这是未标记的 CD4⁺细胞。
5. 标记 CD4⁺CD25⁺CD127^{dim/-}细胞。

四、磁性标记：CD4⁺CD25⁺CD127^{dim/-}调节性 T 细胞

下面给出的磁珠标记规模为 10⁷ 个细胞总量。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。

1. 300×g 离心 10 分钟。去除上清。
2. 每 10⁷ 个细胞总量使用 90 μL 缓冲液重悬。
3. 每 10⁷ 个细胞总量添加 10 μL CD25 磁珠 II。
4. 混匀，2-8 °C 孵育 15 分钟。
5. (可选) 添加染色抗体，例如：抗人 CD25、CD4 或 CD127 抗体。
6. 每 10⁷ 个细胞加入 1-2 mL 缓冲液洗涤细胞，300×g 离心 10 分钟，去上清。
7. 用 500 μL 缓冲液重悬最多 10⁸ 个细胞。

▲ 注：细胞数量增多需相应地增加缓冲液的体积。

8. 进行细胞分选步骤。

五、细胞分选：CD4⁺CD25⁺CD127^{dim/-}调节性 T 细胞

▲ 为了提高细胞的纯度，洗脱的部分可以在第二个分选柱上富集。

1. 将 xM 分选柱置于相对应的分选器中。

2. 用 500 μ L 的缓冲液润洗分选柱：

3. 将细胞悬液转移至分选柱中。

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。加入 500 μ L 的缓冲液，待液体全部流尽，再加入 500 μ L 缓冲液，一共洗 3 次。收集总流出物，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。

▲ 注：若要进行第二次分选，可直接将细胞从第一个分选柱洗脱到第二个分选柱中，不需要使用收集管。

6. 加 1mL 的缓冲液到分选柱中，迅速用塞子推下，得到就是目的细胞。

▲ (可选)为了提高 CD4+CD25+CD127^{dim/-}细胞的纯度，洗脱的部分可以在第二个 xM 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。