

抗-TCR γ/δ 分选磁珠，人(92-01-0040)

[组分]

1 mL 抗-TCR γ/δ 半抗原抗体（同种型：小鼠 IgG1；克隆 11F2）

2 mL 抗半抗原磁珠-FITC：与 FITC 偶联的磁珠和抗半抗原单克隆抗体（同型：小鼠 IgG2a）

[规格] 可分选 10^9 个细胞总量，多达 100 次分离。

[保存形式] 抗半抗原磁珠以悬浮液形式供应，含有 0.1% 明胶和 0.05% 叠氮化钠。

[储存条件] 4 - 8 °C 避光保存，请勿冷冻。有效期见试剂外标签。

[分选原理]

用抗 TCR γ/δ 磁珠试剂盒标记 TCR γ/δ^+ 细胞进行磁分离。首先，用抗-TCR γ/δ 半抗原抗体对细胞进行孵育，然后用抗半抗原磁珠-FITC 进行荧光和磁性标记。然后将细胞悬浮液装入柱中，再放入分选器的磁场中。磁性标记的 TCR γ/δ^+ 细胞被保留在分选柱上，未标记的细胞流过分选柱。从磁场中移除分选柱后，磁性保留的 TCR γ/δ^+ 细胞可作为正选细胞部分被洗脱出来。TCR γ/δ^+ 细胞经荧光染色后进行流式细胞计数分析。

[背景信息]

抗 TCR γ/δ 磁珠试剂盒是一种间接磁性和荧光标记系统，用于标记表达 T 细胞受体 (TCR γ/δ) γ/δ 变体的 T 细胞。多达 10% 的外周血 T 细胞表达 TCR γ/δ 。

抗 TCR γ/δ 磁珠试剂盒是一种磁性标记系统，用于从外周血、淋巴结、胸腺、脾脏和培养细胞中阳性选择或清除表达 TCR γ/δ 的 T 细胞。用抗 TCR γ/δ 磁珠试剂盒分离的 TCR γ/δ +T 细胞已扩增并用于增殖和细胞毒性检测。

[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 Ca^{2+} 或 Mg^{2+} 的缓冲液或培养基。
- 分选柱和分离器。
- (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) 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×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。

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 10^7 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。

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 $40 \mu\text{L}$ 缓冲液重悬。

4. 每 10^7 个细胞总量添加 $10 \mu\text{L}$ 抗-TCR γ/δ 半抗原抗体。

▲ 注意：用抗-TCR γ/δ 磁珠试剂盒标记的细胞不能再用另一种针对相同表位的荧光结合抗-TCR γ/δ 抗体进行染色，因为抗-TCR γ/δ 半抗原抗体会抑制大部分表位。

5. 混合均匀并在 $4-8 \text{ }^\circ\text{C}$ 下孵育 10 分钟。

▲ 注意：在冰上操作可能需要延长孵育时间。温度过高和/或孵育时间过长会导致非特异性细胞标记。

6. 每 10^7 个细胞加入 30 μL 缓冲液和 20 μL 抗半抗原磁珠-FITC。

7. 混匀，4-8 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 分钟。

▲ 注意：在冰上操作可能需要延长孵育时间。温度过高和/或孵育时间过长会导致非特异性细胞标记。

8. 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。

9. 用 500 μL 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。

▲ 注：使用 LD 柱进行去除时，将细胞团重悬在 500 μL 缓冲液中，最多可处理 1.25×10^8 个细胞。

10. 进行细胞分选步骤。

三、细胞分选

▲ 根据总细胞数和 TCR $\gamma/\delta+$ 细胞数选择合适的分选柱和分离器。

▲ 由于使用了 FITC 连接的抗半抗原磁珠，因此可以通过流式细胞仪或荧光显微镜轻松评估 TCR $\gamma/\delta+$ 细胞的分离效率。

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 μL

xL: 3 mL

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，这是未标记的细胞。

xM: $3\times 500\ \mu\text{L}$

xL: $3\times 3\ \text{mL}$

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，得到就是目的细胞。

xM: 1 mL

xL: 5 mL

▲ (可选)为了提高 TCR γ/δ +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。

使用 LD 分选柱进行去除

1. 将 LD 分选柱放入合适的分选器的磁场中。
2. 用 2 mL 缓冲液冲洗分选柱。
3. 将细胞悬浮液转移到分选柱中。
4. 收集通过的未标记细胞，用 2x1 mL 缓冲液冲洗分选柱。收集总流出液。这是未标记的细胞部分。