



Pan T 细胞分选试剂盒（非人灵长类动物）（92-01-0077）

[组分]

1 mL Pan T 细胞生物素抗体混合物：针对 CD11b、CD16、CD20、CD56 和 CD66abce 的生物素结合单克隆抗体混合物。

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。

[规格] 可分选 10^9 个细胞总量，多达 100 次分离。

[保存形式] 生物素-抗体混合物以含稳定剂和 0.05% 叠氮化钠的溶液形式供应。

抗生物素磁珠以含稳定剂和 0.05% 叠氮化钠的悬浮液形式供应。

[储存条件] 4 - 8 °C 避光保存，请勿冻存。有效期见试剂外标签。

本产品适用于恒河猴 (*Macaca mulatta*) 细胞的分离。经测试，该抗体与猕猴 (*Macaca fascicularis*) 有交叉反应。尚未测试与其他非人灵长类动物的交叉反应。

[分选原理]

使用非人灵长类 Pan T 细胞分选试剂盒，通过消耗非 T 细胞（阴性选择）来分选 T 细胞。非 T 细胞用生物素偶联的单克隆抗体混合物（作为一级标记试剂）和偶联磁珠的抗生物素单克隆抗体（作为二级标记试剂）进行间接磁性标记。磁性标记的非 T 细胞在分选器的磁场中保留在分选柱上，而未标记的 T 细胞则通过分选柱流出。

[背景信息]

Pan T 细胞分选试剂盒是一种间接磁性标记系统，用于从猕猴外周血单核细胞（PBMC）中分离未经修饰的 T 细胞。使用抗 CD11b、CD16、CD20、CD56 和 CD66abce 的生物素偶联抗体混合物和抗生物素磁珠对非 T 细胞（即 B 细胞、NK 细胞、单核细胞和粒细胞）进行间接磁性标记。通过去除磁性标记的细胞来分离高纯度的 T 细胞。

[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。
- ▲ 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

处理猕猴抗凝外周血或白膜层时，应与处理人类样本一样，通过密度梯度离心分离 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。

当处理淋巴组织时,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 $30\text{ }\mu\text{m}$ 尼龙网,去除可能堵塞分选柱的细胞团块。

▲ 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 $40\text{ }\mu\text{L}$ 缓冲液重悬。

4. 每 10^7 个细胞总量添加 $10\text{ }\mu\text{L}$ 生物素抗体混合物。

5. 混匀, $4-8^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 分钟。

6. 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。
7. 每 10^7 个细胞总量使用 80 μL 缓冲液重悬。
8. 每 10^7 个细胞总量添加 20 μL 抗生物素磁珠。
9. 混匀，4-8 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 分钟。
10. 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。
11. 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。

12. 进行细胞分选步骤。

三、细胞分选

▲ 根据总细胞数和标记细胞数选择合适的分选柱和分离器。

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 μL xL: 3 $\times$ 3 mL
5. (可选) 在磁场外洗脱保留的细胞。这部分细胞代表磁性标记的非 T 细胞。