

# 小鼠脾脏 CD8<sup>+</sup> T 细胞分离试剂盒使用说明

**Cat NO: IMP-MK017**

## 产品描述

脾脏是机体重要的淋巴器官，内含 B 细胞、T 细胞等多种重要的免疫细胞，其中 CD8<sup>+</sup> T 细胞含量约占 12-15%，小鼠脾脏 CD8<sup>+</sup> T 细胞分离试剂盒可通过**阴性分选法**从小鼠脾脏中分离纯化出 CD8<sup>+</sup> T 细胞，纯化后可用于进一步进行培养扩增或者直接进行 RT-qPCR、Western blot、流式细胞术等各种免疫学实验。

## 适用范围

本试剂盒适用于分离小鼠脾脏中的 CD8<sup>+</sup> T 细胞。

## 规格

本试剂盒规格为 10/25/50 次（以  $1 \times 10^7$  单细胞悬液为 1 次计）

## 分离指标

本试剂盒中的 Biotin-Antibody Mix 中包含多种抗小鼠的生物素抗体，因此可以结合多种非目标细胞实现 CD8<sup>+</sup> T 细胞的分离纯化。

## 运输和存储条件

2-8 °C 保存与运输，所有组分开封后，有效期为 6 个月。

试剂盒组成信息

表 1. 试剂盒组成信息

| 产品货号        | 产品名称                      | 产品规格         | 储存条件       |
|-------------|---------------------------|--------------|------------|
| IMP-MK017LA | Biotin-Antibody Mix       | 100 $\mu$ L  | 2-8°C 6 个月 |
| IMP-MK017MA |                           | 50 $\mu$ L   | 2-8°C 6 个月 |
| IMP-MK017SA |                           | 20 $\mu$ L   | 2-8°C 6 个月 |
| IMP-MK017LB | CD8 <sup>+</sup> T 细胞分选磁珠 | 1000 $\mu$ L | 2-8°C 6 个月 |
| IMP-MK017MB |                           | 500 $\mu$ L  | 2-8°C 6 个月 |
| IMP-MK017SB |                           | 200 $\mu$ L  | 2-8°C 6 个月 |

分离步骤

- 1.取新鲜小鼠脾脏一只，在 70  $\mu$ m 细胞筛网上研磨脾脏，以预冷的 PBS 冲洗细胞筛网，收集细胞悬液于 50 mL 离心管中，500 g，离心 5 min（一个小鼠脾脏可取得 3-5 $\times$ 10<sup>7</sup>个脾脏细胞）。
- 2.离心结束，弃上清，加入 5 mL 红细胞裂解液，室温裂解 5 min，再加入 20 mL PBS，500 g，离心 5 min。
- 3.离心完成后，弃上清，将脾脏细胞重悬于 PBS，细胞悬液用 70  $\mu$ m 细胞筛网过滤后，计数。计数完成后，将脾脏细胞悬液 500 g，离心 5 min。
- 4.将细胞重悬于分选 buffer 中，调整细胞密度为 1 $\times$ 10<sup>8</sup> cells/mL（分选 buffer 为含有 2 mM EDTA 和 2% 胎牛血清（FBS）的 PBS 或者含有 2 mM EDTA 和 0.5% BSA 的 PBS，使用前需预先通过 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤除菌），调整细胞密度为 1 $\times$ 10<sup>8</sup> cells/mL。
- 5.取 100  $\mu$ L 细胞悬液加入 2  $\mu$ L Biotin-Antibody Mix 混合均匀，4°C 孵育 15 min，期间每隔 5 min 轻弹管壁使细胞与抗体混合均匀。
- 6.孵育完成后加入 1 mL CD8<sup>+</sup> T 细胞分选 Buffer 重悬，500 g，离心 5 min，弃去上清，加入 100  $\mu$ L 的 CD8<sup>+</sup> T 细胞分选 Buffer 重悬。
7. 吸取 20  $\mu$ L CD8<sup>+</sup> T 细胞分选磁珠（吸取前涡旋振荡重悬磁珠，确保磁珠完全重悬，加入 1mL CD8<sup>+</sup> T 细胞分选 Buffer 进行重悬清洗磁珠，1000 g 离心 5 min，弃去上清，加入 10  $\mu$ L 的 CD8<sup>+</sup> T 细胞分选 Buffer 重悬）。

8.加入 20  $\mu$ L CD8<sup>+</sup> T 细胞分选磁珠，混匀后 4° C 孵育 10 min，期间每隔 5 min 轻弹管壁使细胞和磁珠混合均匀（此试剂盒说明书为分选 1 $\times$ 10<sup>7</sup>个脾脏细胞中的 CD8<sup>+</sup> T 细胞的使用说明，如果分选更多的细胞，则可按比例增加 Biotin-Antibody Mix、CD8<sup>+</sup> T 细胞分选磁珠的用量，少于

$1 \times 10^7$  个细胞则 将细胞悬液体积补至 100  $\mu\text{l}$ ，加入 2  $\mu\text{l}$  Biotin-Antibody Mix 和 10  $\mu\text{l}$  CD8<sup>+</sup> T 细胞分选磁珠）。

9. 孵育完成后，加入 2.5 ml 的 CD8<sup>+</sup> T 细胞分选 Buffer 重悬，用移液器上下混合吹打 5 次混匀（避免剧烈振荡或者上下颠倒混匀），移入一个无菌流式管中。

10. 将含有细胞的流式管置于磁力架上，静置 5 min，待磁珠被吸附，细胞悬液变为清澈后将细胞悬液吸入一个无菌离心管中（**期间流式管在磁力架中**），此细胞悬液中即包含纯化的小鼠脾脏 CD8<sup>+</sup> T 细胞，500 g，离心 5 min，弃去上清，收集细胞。

### 注意事项

1. 磁珠和抗体混合液使用和保存过程中均应避免冷冻、高速离心等操作。
2. 操作过程应在无菌环境下进行，必须保证操作过程中使用的所有容器及所有直接接触细胞液的器具严格无菌。
3. 本产品需要与磁力架配套使用。
4. 本产品仅供科研使用。