

小鼠脾脏 CD4⁺ T 细胞分离试剂盒使用说明

Cat NO: IMP-MK022

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 CD4⁺ T 细胞含量约占20-25%，小鼠脾脏 CD4⁺ T 细胞分离试剂盒可通过阳性分选法从小鼠脾脏中分离纯化出 CD4⁺ 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 CD4⁺ T 细胞。

运输和存储条件

2-8 °C 保存与运输，保质期为参考下表，所有组分开封后，有效期为 6 个月。

试剂盒组成信息

表 2. 试剂盒组成信息

产品货号	产品名称	产品规格	储存条件
IMP-MK022SA	CD4 ⁺ T 细胞分选抗体	20 μL	2-8°C 6 个月
IMP-MK022MA		40 μL	
IMP-MK022LA		100 μL	
IMP-MK022SB	链霉亲和素纳米磁珠	100 μL	2-8°C 6 个月
IMP-MK022MB		200 μL	
IMP-MK022LB		500 μL	

分离步骤

1.取新鲜小鼠脾脏一只，在 70 μm 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 $5\text{-}10\times 10^7$ 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 μm 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 1×10^8 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 μm 滤膜过滤除菌），调整细胞密度为 1×10^8 cells/mL。

5.取 100 μL 细胞悬液加入 2 μL CD4^+ T 细胞分选抗体混合均匀，4 $^{\circ}\text{C}$ 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 分选 Buffer 重悬，500 g，离心 5 min，弃去上清，加入 100 μL 的分选 Buffer 重悬。

7. 吸取 10 μL 链霉素亲和磁珠，与细胞混匀后4 $^{\circ}\text{C}$ 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 1×10^7 个脾脏细胞中的 CD4^+ T 细胞的使用说明，如果分选更多的细胞，则可按比例增加抗体、链霉亲和素磁珠的用量，少于 1×10^7 个细胞则将细胞悬液体积补至 100 μL ，加入 2 μL 抗体和 10 μL 链霉亲和素磁珠）。

8.孵育完成后，加入 1 ml 的分选 Buffer 重悬，500 g，离心 5 min，去除上清，加入 500 μL 分选 Buffer 重悬，准备磁性分选。

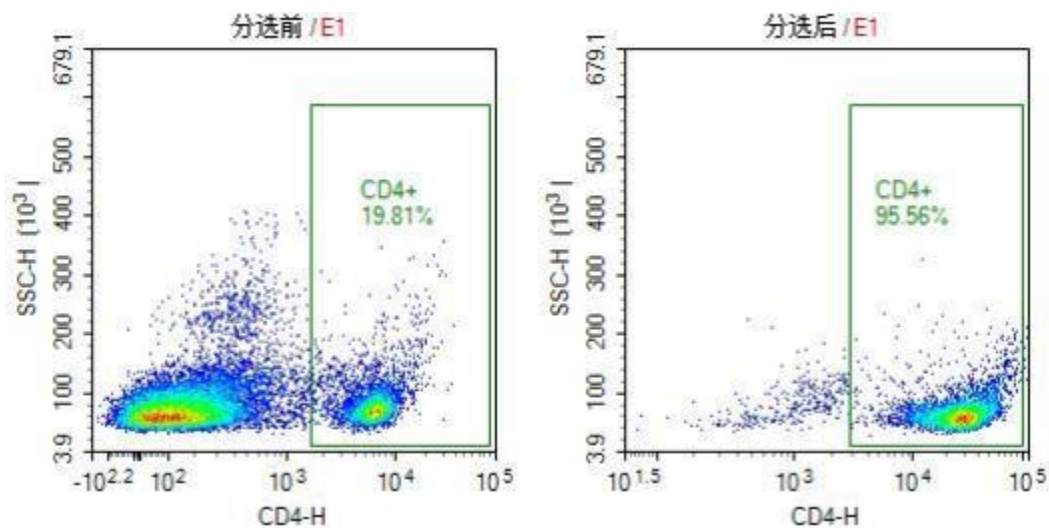
9.将分选柱放入磁场中，加入 500 μL 分选 Buffer 润洗柱子。

10.将重悬好的细胞悬液缓慢加入分选柱中，注意不要产生气泡，待分选柱中的液体流尽时再次加入 500 μL 分选 Buffer 清洗两次，流出的液体即为未结合磁珠的细胞。

11.将分选柱从磁场中移出，置于合适的离心管中，吸取 1mL 分选 Buffer 加入分选柱，使用配套的活塞将结合在分选柱上的细胞推出，收集推出的细胞即为目标细胞。

分选效果

对使用本试剂盒分选前后的小鼠脾脏中的 $CD4^+$ T 细胞进行流式细胞分析检测显示，分选前后的 $CD4^+$ T 细胞纯度 分别为 19.81%和 95.56%。



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。