

## EasySort™ Mouse CD4<sup>+</sup>T Cell Isolation Kit

Cat. No: MIM002N

Size: 10/100/200 Assays

产品编号	产品名称	10 Assays	100 Assays	200 Assays	Storage
MIM002NA	EasySort™ Mouse CD4 <sup>+</sup> T Beads Streptavidin 1.0-N	90 µL	900 µL	900 µL×2	2~8°C
MIM002NB	EasySort™ Mouse CD4 <sup>+</sup> T Cell Isolation Cocktail	27 µL	270 µL	270 µL×2	2~8°C
	说明书			1 份	

### 保存条件

2-8°C 可保存一年，避光保存，避免冻融。

### 检测原理

小鼠 CD4<sup>+</sup>T 细胞分选是通过阴性分选法从小鼠脾脏细胞或其它组织的单细胞悬液中分离出 CD4<sup>+</sup>T 细胞。原理是选用不同的生物素（biotin）标记单克隆抗体对非目的细胞（非 CD4<sup>+</sup>T 细胞）进行标记，而后通过链霉亲和素（streptavidin）标记的磁珠对非目标细胞进行清除，从而达到小鼠 CD4<sup>+</sup>T 细胞分选的目的。它可以保持目的细胞未受刺激的原始状态，得到的细胞不带有抗体和磁珠标记。

EasySort™ Mouse CD4<sup>+</sup>T Cell Isolation Kit 是一款能快速简便的分离出高纯度小鼠 CD4<sup>+</sup>T 细胞的产品。本试剂盒适用于分离小鼠脾脏和淋巴结的 CD4<sup>+</sup>T 细胞，分离出的细胞可直接进行下游应用。

### 自备试剂耗材及仪器

#### 1. 试剂：

PBS、优质胎牛血清、EDTA

#### 2. 耗材：

一次性无菌注射器、70 µm 细胞筛网、眼科剪、眼科镊、1.5 mL/2 mL EP 管、15 mL 离心管、流式管

#### 3. 仪器：

光学显微镜、水平离心机、5 mL 分选磁力架

### 实验操作指南

#### 以下操作需在无菌条件下进行

##### ➤ 试剂准备

分选 buffer: 含有 2 mM EDTA 和 2%胎牛血清 (FBS) 的 PBS 或含有 2 mM EDTA 和 0.5% BSA 的 PBS, 经过 0.22 µm 过滤除菌后备用。

**注：配制后于 4°C 冰箱中密封保存，1 周内使用完。**

### For Research Use Only

### 小鼠脾脏单细胞悬液的制备

- 取小鼠脾脏，注意避免附带过多的结缔组织。
- 在 70  $\mu\text{m}$  细胞筛网上研磨脾脏，用预冷的 PBS 冲洗细胞筛网，收集细胞悬液于 15 mL 离心管，300 g 离心 5 min。
- 弃上清，用分选 buffer 重悬脾细胞，用 70  $\mu\text{m}$  细胞筛网过滤后进行细胞计数。调整细胞密度为  $2 \times 10^8$  个/mL。

注：每只小鼠可获得约  $2-4 \times 10^8$  个脾脏细胞。

### 细胞分选

- 取 50  $\mu\text{L}$  细胞悬液 ( $1 \times 10^7$  个细胞) 于 2 mL EP 管，加入 2.7  $\mu\text{L}$  Mouse CD4<sup>+</sup>T Cell Isolation Cocktail，混匀后室温孵育 5 min。  
注：请确保细胞为单细胞悬液。
- 孵育完成后，加入分选 buffer 至 2 mL，300 g 离心 5 min，弃去上清，再加入 50  $\mu\text{L}$  分选 buffer 重悬细胞。
- 洗涤 Beads Streptavidin 1.0-N：将 Beads 用涡旋仪混匀 20 秒后，取 9  $\mu\text{L}$  于 1.5 mL EP 管，放在 5 mL 分选磁力架（自备）静置 30 s 磁分离去除上清，用 1 mL 分选 buffer 吹打混匀 Beads，室温静置 5 min，磁分离去除上清，9  $\mu\text{L}$  分选 buffer 重悬 Beads。
- 将细胞转移至流式管底部（注：避免沿管壁加入），加入 9  $\mu\text{L}$  洗涤过的 Mouse CD4<sup>+</sup>T Beads Streptavidin 1.0-N，混匀后室温孵育 5 min。

注：

➢ 如需分选更多细胞，则在保证细胞密度不变的情况下按比例增加 Mouse CD4<sup>+</sup>T Cell Isolation Cocktail 和 Mouse CD4<sup>+</sup>T Beads Streptavidin 1.0-N 用量；如果分选少于  $1 \times 10^7$  个细胞，则将细胞悬液体积补至 50  $\mu\text{L}$ ，加入 2.7  $\mu\text{L}$  Mouse CD4<sup>+</sup>T Cell Isolation Cocktail 和 9  $\mu\text{L}$  洗涤过的 Mouse CD4<sup>+</sup>T Beads Streptavidin 1.0-N。

➢ 5 mL 流式管适用分选细胞数不超过  $2 \times 10^8$  个。

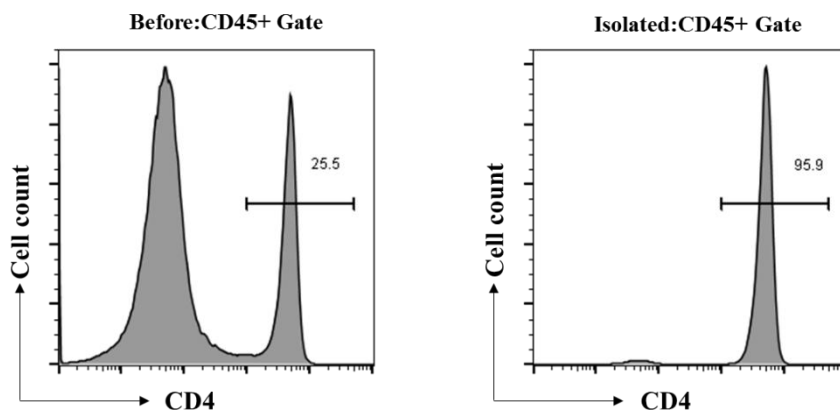
- 反应结束后添加分选 buffer 至 2.5 mL，用移液器上下吹打 7-8 次混匀至无肉眼可见磁珠颗粒，放在 5 mL 分选磁力架（自备）上静置磁吸 3 min。

注：加入分选 buffer 后需充分混匀液体，避免磁珠结块影响分选效率。

- 将细胞悬液转移至干净的离心管，此为分选得到的小鼠 CD4<sup>+</sup>T 细胞，300 g 离心 5 min，弃上清，加入后续实验所需缓冲液重悬细胞，可直接用于后续细胞培养或其他生物实验。

注：如实验对回收率有较高要求，可重复步骤 e - 步骤 f，混合两次分选得到的细胞悬液。

### 结果展示



For Research Use Only

如上图所示，从 C57BL/6 小鼠脾脏细胞中分选 CD4<sup>+</sup>T 细胞，分选前后的细胞用 Elab Fluor® Violet 450 Anti-Mouse CD45 抗体（克隆号 30-F11）和 PE Anti-Mouse CD4 抗体（克隆号 GK1.5）标记后进行流式细胞仪分析，小鼠脾脏细胞分选前后 CD45<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 细胞比例分别为 25.5%和 95.9%。

## 注意事项

1. 本产品仅供科研使用。
2. 为了您的安全与健康，请穿戴实验室工作服和一次性手套进行操作，并遵守实验室试剂操作规程。
3. 磁珠使用和保存过程中应避免冻融。
4. 用于分选的单细胞悬液需用细胞筛网过滤掉细胞团块和组织，避免细胞成团影响分选纯度。
5. 细胞悬液制备后立即进行分选，放置时间越长细胞活性受到影响越大。
6. 细胞悬液和磁珠需直接加入无菌流式管底部，避免粘在壁上导致反应不充分影响分选效率。
7. 为保证细胞活性，实验全过程除室温孵育外，其他操作尽量在冰上完成。
8. 建议选用低吸附移液器吸头和离心管，避免因吸附造成磁珠和抗体的损耗。
9. 本试剂盒需与磁力架配套使用。
10. 样本类型、样本制备及实验操作对最终分选细胞纯度具有重要影响，本产品细胞纯度是对正常小鼠脾脏样本进行分选后所得。