

EasySort™ Mouse NK Cell Isolation Kit

Cat. No: MIM005N

Size: 10/100/200 Assays

| 产品编号 | 产品名称 | 10 Assays | 100 Assays | 200 Assays | Storage |
|----------|--|-----------|------------|------------|---------|
| MIM005NA | EasySort™ Mouse NK Beads Streptavidin 1.0-N | 210 µL | 700 µL × 3 | 700 µL × 6 | 2-8°C |
| MIM005NB | EasySort™ Mouse NK Cell Isolation Cocktail | 61 µL | 610 µL | 610 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 NK 细胞分选是通过阴性分选法从小鼠脾脏单细胞悬液中分离出 NK 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 NK 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 NK 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，得到的细胞不带有任何抗体和磁珠标记。

EasySort™ Mouse NK Cell Isolation Kit 是一款能快速简便的分离出高纯度小鼠 NK 细胞的产品。本试剂盒适用于分离小鼠脾脏的 NK 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

For Research Use Only

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。

➤ 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 μm 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 \times g 离心 5 min。
- 弃上清, 用分选 buffer 重悬脾细胞, 用 70 μm 细胞筛网过滤后进行细胞计数。调整细胞密度为 2×10^8 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 μL 细胞悬液 (1×10^7 个细胞) 于 2 mL EP 管, 加入 6.1 μL Mouse NK Cell Isolation Cocktail, 混匀后室温孵育 10-15 min。
- 孵育完成后, 加入分选 buffer 至 2 mL, 300 \times g 离心 5 min, 弃上清, 再加入 50 μL 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 21 μL 于 1.5 mL EP 管, 放在 5 mL 分选磁力架 (自备) 静置 1 min 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。
- 用 50 μL 细胞悬液重悬洗涤过的 Beads Streptavidin 1.0-N, 并转移至流式管底部 (**注: 避免沿管壁加入**), 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 NK Cell Isolation Cocktail 和 Mouse NK Beads Streptavidin 1.0-N 的用量; 如果分选少于 1×10^7 个细胞, 则将细胞悬液体积补至 50 μL , 加入 6.1 μL Mouse NK Cell Isolation Cocktail 和 21 μL 洗涤过的 Mouse NK Beads Streptavidin 1.0-N。

✧ 5 mL 流式管适用分选体系小于或等于 2×10^8 细胞悬液。

- 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。

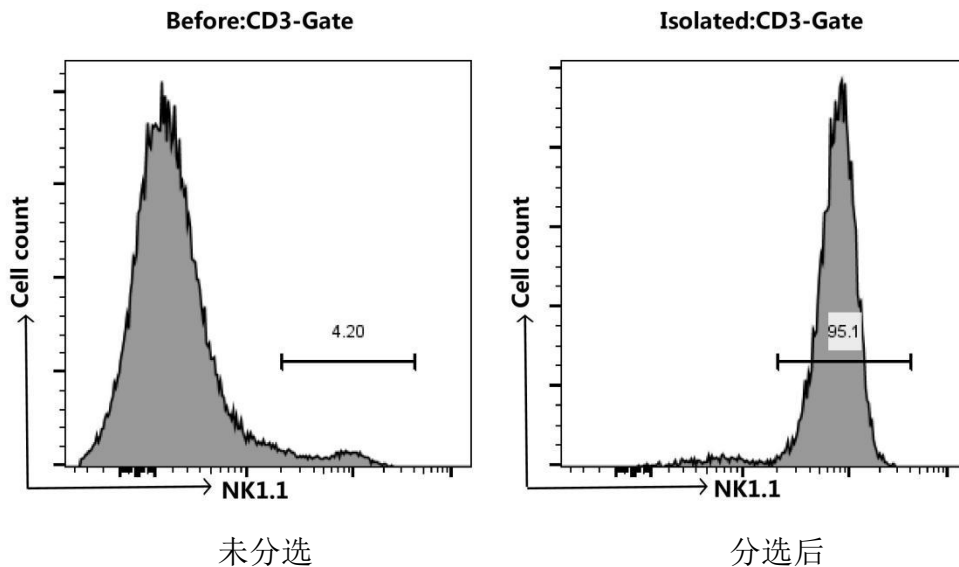
- 将细胞悬液转移至干净的离心管, 此为第一次分选得到的 NK 细胞。向流式管中添加分选 buffer

For Research Use Only

至 2.5 mL，用移液器上下吹打磁珠悬液 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。

g) 将细胞悬液转移至步骤 e) 离心管，混合两次分选所得细胞悬液，即为小鼠 NK 细胞， $300\times g$ 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。

结果展示



如上图所示，从 C57BL/6 小鼠脾脏细胞中分选 NK 细胞，小鼠脾脏细胞分选前后用 APC Anti-Mouse CD3 Antibody[17A2](E-AB-F1013E)和 PE Anti-Mouse CD161/NK1.1 Antibody[PK136](E-AB-F0987D)进行检测，分选前后的 $CD3^+NK1.1^+$ 细胞比例分别为 4.2%和 95.1%。

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。