

# ImunoSep™ Human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> Treg Isolation Kit

货号: 712310 100 次

储存: 2-8°C。避免冷冻。

有效期: 详见试剂瓶。

注意事项: 为保证分选的细胞不被污染, 请在生物安全柜中执行所有细胞分选步骤。

## 产品介绍

人 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>Treg 分选试剂盒, 用于分离人外周血单个核细胞中的 Treg 细胞, 首先, 利用试剂 A、B、C 对 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>进行免疫磁珠正选, 再用试剂 D 将分离的 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>细胞上的磁珠去除, 得到不带磁珠的 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>细胞, 然后加入试剂 E 和 F, 去掉 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>high</sup> 细胞, 从而分选到高度纯化的 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>细胞, 这些细胞表达高水平的 Foxp3, 可立即用于下游应用。

## 成分

ImunoSep™ Human CD25 Positive Selection Cocktail (A), 1 x 1 mL

ImunoSep™ Releasable Beads (B), 1 x 1 mL

ImunoSep™ Human CD4<sup>+</sup> T Cell Enrichment Cocktail (C), 1 x 1 mL

ImunoSep™ Release Buffer (D), 2 x 1 mL

ImunoSep™ Human CD127 high Depletion Cocktail (E), 1 x 1 mL

ImunoSep™ Isolation Beads (F), 2 x 1 mL

## 相关试剂

eBioscience™ 人调节性 T 细胞染色试剂盒 1#88-8999-40

eBioscience™ 人调节性 T 细胞染色试剂盒 2#88-8998-40

eBioscience™ 人调节性 T 细胞染色试剂盒 3#88-8995-40

Foxp3/ 转录因子染色液/流式细胞固定破膜液#00-5523-00

## 需要另外准备的试剂和耗材

ImunoSep™ Buffer (500 mL) #604050。

分选磁极 #602005。

流式管 (12×75 mm, 5 mL) #352058。

离心管 (15 mL)。

## 警告

分选磁极可产生强磁场。远离心脏起搏器、信用卡、磁性 ID 卡、手表、电脑显示器和硬盘等电子设备, 以防止损坏这些仪器设备。

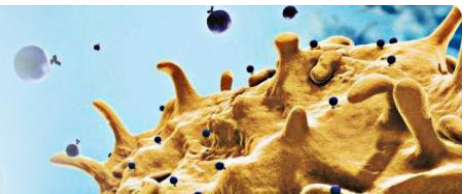
## A. 细胞准备

1. 有关正常人外周血单个核细胞的制备, 建议彻底清洗单个核细胞, 去除血小板, 以获得最佳细胞分选效果。
2. 建议使用 ImunoSep™ Buffer (含 EDTA) 。

## B. 细胞分离

### 实验流程

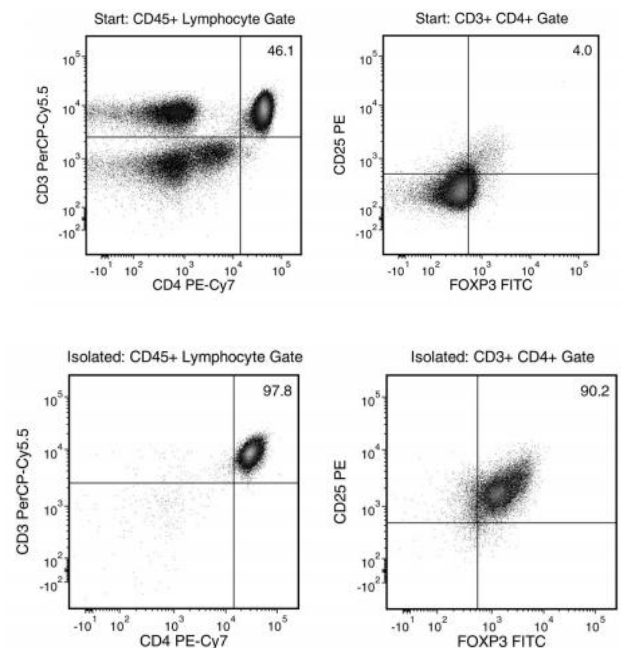




1. 用适当体积的 ImunoSep™ Buffer 重悬细胞，调整细胞浓度至  $5 \times 10^7$  / mL，制备单细胞悬液。  
**注意：细胞必须是单细胞悬液。如有必要，进行涡旋振荡或用移液管移除团块，然后再继续细胞分选。**
2. 在 12×75 mm，5 mL 流式管中放置所需数量的细胞，但不超过  $1 \times 10^8$  细胞。
3. 每 1 mL 细胞悬液添加 50  $\mu$ L ImunoSep™ Human CD25 Positive Selection Cocktail (A)。在室温下孵育 5 分钟。
4. 涡旋 ImunoSep™ Releasable Beads (B)，使其保持均匀的状态。
5. 每 1 mL 细胞悬液添加 30  $\mu$ L 试剂 ImunoSep™ Releasable Beads (B)。
6. 每 1 mL 细胞悬液添加 50  $\mu$ L 试剂 ImunoSep™ Human CD4+ T Cell Enrichment Cocktail (C)，混匀，室温孵育 5 分钟。
7. 添加 ImunoSep™ Buffer 至 2.5 mL。用 1 mL Tip 吹打 3 次混合均匀，请勿涡旋混匀。
8. 将盛有细胞悬液的 5 mL 流式管插入磁极中，使流式管底部通过磁极底部孔道，直至接触到工作台面。在室温条件下静置 10 分钟。
9. 保持流式管在磁极中，将磁极和流式管一同拿起，将上清液中未结合的细胞（包含 CD4 细胞、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 细胞）倒入无菌离心管中。流式管倒置时长不可超过 2 秒。
10. 从磁极中取出含有结合 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 细胞的流式管，添加 ImunoSep™ Buffer 至 2.5 mL。用 1 mL Tip 吹打 3 次混合均匀，请勿涡旋混匀。
11. 将流式管置于磁极静置 5 分钟，保持流式管在磁极中，将磁极和流式管一同拿起，将上清液倒入无菌离心管中。流式管倒置时长不可超过 2 秒。
12. 重复步骤 10-11 共 2-3 次。
13. 从磁极中取出含有 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 细胞的流式管，再向其中加入与步骤 1 等体积的 ImunoSep™ Buffer。
14. 每 1 mL 细胞悬液添加 100  $\mu$ L 试剂 ImunoSep™ Release Buffer (D)，上下吹打 5 次。
15. 每 1 mL 细胞悬液添加 50  $\mu$ L 试剂 ImunoSep™ Human CD127 high Depletion Cocktail (E)，室温孵育 5 分钟。

16. 涡旋试剂 ImunoSep™ Isolation Beads (F) 30 秒。
17. 每 1 mL 细胞悬液添加 10  $\mu$ L 试剂 ImunoSep™ Isolation Beads (F)，室温孵育 5 分钟。
18. 添加 ImunoSep™ Buffer 至 2.5 mL。用 1 mL Tip 吹打 3 次混合均匀，请勿涡旋混匀。
19. 置于磁极孵育 5 分钟。
20. 保持流式管在磁极中，将磁极和流式管一同拿起，将分离的目的细胞 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup> 倒入新的无菌离心管中。

### 分选细胞流式检测报告



样本为新鲜或冻存的 PBMC，分选后人 CD4<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>CD25<sup>+</sup> 纯度为  $85.0 \pm 4.8\%$  (平均值  $\pm$  SD)。上面的例子中，分选前和分选后，CD4<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>CD25<sup>+</sup> 的纯度分别为 1.8% 和 88.2%。