

# 人 CD3+ T 细胞分离试剂盒使用说明书（负选）

## 【产品名称】

中文名称：人 CD3+ T 细胞分离试剂盒

英文名称：Human Pan T cell isolation kit

## 【编号】

Flosep-C-003N

## 【细胞处理量】

用于处理  $1 \times 10^9$  个细胞

## 【分选方法】

负选

## 【试剂盒组成】

成份名称	物理性状	规格	数量
人 Fc 受体阻断剂	无色透明液体	1mL /支	2 支
人 CD3 细胞生物素化抗体	无色透明液体	2mL/支	1 支
链霉亲和素磁珠	棕色混悬液	1mL/支	1 支
细胞分选缓冲液	无色透明液体	500mL/瓶	1 瓶

## 【预期用途】

适用于从人外周血、浓缩白细胞来源的单个核细胞中负选出 CD3+ T 细胞。

## 【贮藏条件与有效期】

人 Fc 受体阻断剂、生物素化抗体，链霉亲和素磁珠及细胞分选缓冲液均置于 2-8°C 保存，有效期为 12 个月；

生产日期，有效期至：见标签。

## 【产品简介】

本产品能够从新鲜或冻存的外周血单个核细胞中简便快捷的负选出高纯度的 CD3+ T 细胞。能够处理的总细胞量为  $1 \times 10^9$  次方，可为基础和临床研究使用 CD3+ T 细胞提供一个有力的武器。

## 【操作步骤】

### 一 单个核细胞的提取（以 50mL 外周血为例）

- 1.取 50ml 外周血，若需要提取血浆，则取血浆提取后的下层红色细胞沉淀，加入生理盐水或 PBS 至原体积；
- 2.取 2 支 50mL 离心管，分别加入 15mL 淋巴细胞分离液，并将 1 步骤中的血样分别缓缓铺加到淋巴细胞分离液的上层；  
**注意：铺加血样时建议速度适中，尤其是刚开始的铺加，避免破坏淋巴细胞分离液与血样的界面。**
- 3.室温下，800g 离心 20min（无闸减速）；
- 4.离心后，离心管中样品由上到下分为 4 层：血浆层-白膜层-人淋巴细胞分离液层-红细胞与粒细胞的沉淀。分别小心吸取白膜层及其以下约一半的液体于新的离心管中，并加入生理盐水或 PBS 至 40mL 体积，混匀，300g 离心 10min；
- 5.弃上清，沉淀再次用 40mL 的生理盐水或 PBS 重悬，300g 离心 10min；
- 6.弃上清，沉淀即为 PBMC，备用。

### 二 人 CD3+ T 细胞分离



**注意：**整个细胞分离过程可大致分为 PBMC 洗涤-Fc 受体阻断剂孵育-抗体孵育-洗涤-磁珠孵育-磁吸等步骤，其中，PBMC 洗涤，Fc 受体阻断剂孵育，抗体孵育在离心管操作即可，磁珠的孵育与磁吸等则转移至流式管中操作。

**1 PBMC 洗涤：**往 PBMC 中加入预冷的细胞分选缓冲液 ( $1 \times 10^7$  cells / 1-5mL)，300g 离心 10min；

**2 调整细胞密度与预冷:** 弃上清, 加入一定量的预冷的细胞分选缓冲液, 将 PBMC 浓度调整为  $1 \times 10^8$  cells/mL, 冰浴或  $4^{\circ}\text{C}$  预冷 5min;

**注意:** 若所分离的细胞数量过少, 例如只有  $1 \times 10^7$  cells, 则可将细胞密度调整为  $5 \times 10^7$  cells/mL。

**3 Fc 受体阻断剂孵育:** 将 Fc 受体阻断剂以 200uL/ $1 \times 10^8$  cells 的比例加入到 PBMC 中, 迅速用移液枪轻柔吹打, 充分混合后置于  $4^{\circ}\text{C}$  孵育 5min;

**4 生物素化抗体孵育:** Fc 受体阻断剂孵育完毕后, 将生物素化抗体以 200uL 抗体/ $1 \times 10^8$  初始 PBMC 的比例将加入细胞悬液中, 迅速用移液枪轻柔吹打, 充分混合后置于  $4^{\circ}\text{C}$  孵育 15min;

**5 未结合抗体的洗涤:** 孵育完毕后, 加入细胞分选缓冲液 ( $1 \times 10^7$  cells /1-5mL), 300g 离心 10min 后, 弃上清, 加入一定量的细胞分选缓冲液, 使细胞悬液体积恢复到初始时的水平;

**注意:** 弃上清时, 往往在管口处残留些许缓冲液, 尽可能将这些残留液用移液枪等吸取干净, 必要时可再次用缓冲液洗涤, 避免残留液中的部分抗体成分对后续的磁珠与细胞的结合产生干扰。

**6 磁珠孵育:** 将细胞悬液转移至流式管, 以 100uL 磁珠/ $1 \times 10^8$  初始 PBMC 的比例将链霉亲和素磁珠加入到 PBMC 中, 迅速用移液枪轻柔吹打均匀,  $4^{\circ}\text{C}$  孵育 10min;

**7 磁吸:** 孵育完毕后, 磁吸 3min, 收集未磁吸的细胞悬液;

**注意:** 若磁吸时细胞量较少, 可加入 1mL 的细胞分选缓冲液重悬细胞后再磁吸。

**8 再次磁吸:** 加入与第 7 步同体积的细胞分选缓冲液, 轻柔吹散磁珠后再次磁吸 3min, 收集未磁吸的液体并与第 7 步中所收集的液体合并;

**注意:** 1) 将合并的细胞悬液重复磁吸一次, 可进一步去除非目的细胞;

2) 当有的样本细胞分选纯度不高时, 可在此步重复加入少量磁珠, 并重复磁吸步骤, 可进一步提高纯度, 但该操作会损失部分目的细胞。

**9 所得细胞即为 CD3+ T 细胞。**

### 【产品性能指标】

产品性能符合本企业制定的产品技术要求。

### 【生产企业】

企业名称: 福建三一造血技术有限公司

生产地址: 福建省福州市高新技术产业园创新园 10 号楼

邮政编码: 350108

电话号码: (0591) 22889285/4001155980

邮箱地址: sales@stemery.cn

网址: <http://www.stemery.cn>

