

REDCONJU · PRODUCT MANUAL

# 人 CD4 T 细胞阴选试剂盒（无柱）

Human CD4 T Cell Negative Selection Kit (Column-free)

|       |                                 |      |                                                                 |
|-------|---------------------------------|------|-----------------------------------------------------------------|
| 货号    | HXL-0000HF4-0.1 / HXL-0000HF4-1 | 规格   | 0.1 mL（最多 $1 \times 10^8$ 起始细胞） / 1 mL（最多 $1 \times 10^8$ 起始细胞） |
| 用途/方式 | 阴性选择 · 无柱法                      | 推荐用量 | $1 \times 10^8$ 起始细胞 / 标准反应                                     |
| 适用样本  | 人 PBMC、白膜层及人源单细胞悬液              | 保存条件 | 2–8°C 保存；SA 磁珠禁止冷冻                                              |

仅供科研使用（RUO），不用于临床诊断或治疗。

## 1. 产品信息

| 项目     | 内容                                                                                                          |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 产品名称   | 人 CD4 T 细胞阴选试剂盒                                                                                             |
| 英文名称   | Human CD4 T Cell Negative Selection Kit                                                                     |
| 品牌     | 弘溪联 RedConju                                                                                                |
| 分选方式   | 阴性选择；取上清获得未被磁珠结合的目标 T 细胞                                                                                    |
| 适用样本   | 人 PBMC、白细胞或其他人源单细胞悬液                                                                                        |
| 试剂盒规格  | 最高可处理 $1 \times 10^8$ 个起始细胞                                                                                 |
| 标准反应单位 | 每 $1 \times 10^8$ 个细胞使用 10 $\mu$ L Cocktail 抗体 + 10 $\mu$ L SA 磁珠；并按流程加入 60 $\mu$ L + 480 $\mu$ L 分选 Buffer |
| 保存条件   | 2–8 °C 保存；避免冷冻 SA 磁珠                                                                                        |
| 用途     | 仅供科研使用（RUO），不用于临床诊断或治疗                                                                                      |

## 2. 试剂盒组成

| 组分                     | 规格   | 说明                    |
|------------------------|------|-----------------------|
| 人 CD4 T 阴选 Cocktail 抗体 | 1 mL | 用于标记非目标细胞             |
| SA 磁珠                  | 1 mL | 与生物素化抗体结合，用于磁性去除非目标细胞 |
| 说明书                    | 1 份  | 本文件                   |

注：分选 Buffer 需自备，可使用 0.1% BSA-PBS buffer 或 2% FBS-PBS buffer，pH7.4。  $1 \times 10^8$  个细胞全量操作时，理论需约 54 mL 分选 Buffer，其中抗体孵育后加入约 6 mL，磁珠孵育后加入约 48 mL。

## 3. 分选原理

本试剂盒通过生物素 Cocktail 抗体标记非 CD4 T 细胞，再加入 SA 磁珠结合被标记细胞。经磁吸后，被标记的非目标细胞保留在磁场侧，未被结合的 CD4<sup>+</sup> T 细胞 保留在上清中。

本产品为阴选体系，目标细胞不直接与磁珠结合，最终收集磁吸后的上清液。

4. 实验前准备

| 项目        | 要求                                                     |
|-----------|--------------------------------------------------------|
| 细胞状态      | 制备单细胞悬液，尽量去除团块、死细胞、红细胞和血小板残留。                          |
| 细胞计数      | 准确计数后，按每 $1 \times 10^6$ 个细胞重悬至 40 $\mu\text{L}$ 细胞悬液。 |
| 分选 Buffer | 0.1% BSA-PBS buffer 或 2% FBS-PBS buffer，建议预冷并全程保持一致。   |
| 磁珠处理      | 使用前充分重悬 SA 磁珠，确保磁珠均一。                                  |
| 耗材建议      | 根据总反应体积选择合适离心管；处理大于 $1 \times 10^6$ 个细胞时建议分管操作。        |

5. 标准操作流程

| 步骤 | 操作内容                                  | 条件                        | 时间 / 体积                                   |
|----|---------------------------------------|---------------------------|-------------------------------------------|
| 1  | 准备细胞悬液。                               | —                         | 40 $\mu\text{L}$ ；含 $1 \times 10^6$ cells |
| 2  | 加入生物素 Cocktail 抗体，轻柔混匀。               | 2–8 °C                    | 10 $\mu\text{L}$                          |
| 3  | 抗体孵育。                                 | 2–8 °C                    | 10 min                                    |
| 4  | 加入分选 Buffer，轻柔混匀。                     | 0.1% BSA-PBS 或 2% FBS-PBS | 60 $\mu\text{L}$                          |
| 5  | 加入 SA 磁珠，轻柔混匀。                        | 室温                        | 10 $\mu\text{L}$                          |
| 6  | 磁珠孵育。                                 | 室温                        | 5 min                                     |
| 7  | 再次加入分选 Buffer，轻柔混匀。                   | 0.1% BSA-PBS 或 2% FBS-PBS | 480 $\mu\text{L}$                         |
| 8  | 第一次磁吸。                                | 磁力架（常温）                   | 5 min（如果是联排磁力架7 min）                      |
| 9  | 将上清液转移至新的离心管中，避免吸到磁珠。                 | —                         | —                                         |
| 10 | 第二次磁吸。                                | 磁力架（常温）                   | 2 min                                     |
| 11 | 收集上清液，上清即为富集后的 CD4 <sup>+</sup> T 细胞。 | —                         | 取上清                                       |

6. 标准反应体系

| 组分              | 标准用量              | 备注                      |
|-----------------|-------------------|-------------------------|
| 细胞悬液            | 40 $\mu\text{L}$  | 含 $1 \times 10^6$ cells |
| 生物素 Cocktail 抗体 | 10 $\mu\text{L}$  | 按细胞数等比例增加               |
| 分选 Buffer I     | 60 $\mu\text{L}$  | 抗体孵育后加入；按细胞数等比例增加       |
| SA 磁珠           | 10 $\mu\text{L}$  | 按细胞数等比例增加；使用前充分重悬       |
| 分选 Buffer II    | 480 $\mu\text{L}$ | 磁珠孵育后、磁吸前加入；按细胞数等比例增加   |
| 磁吸前总体积          | 600 $\mu\text{L}$ | 加入 Buffer II 后进入磁吸步骤    |

7. 用量调整原则

以  $1 \times 10^6$  个细胞为 1 个标准反应单位。更多细胞时，细胞悬液体积、Cocktail 抗体、SA 磁珠、分选 Buffer I 和分选 Buffer II 均按比例同步增加。

计算方式：放大倍数  $n = \text{起始细胞数} \div 1 \times 10^6$ 。各组分量 = 标准用量  $\times n$ 。

示例：如果起始细胞为  $5 \times 10^6$  个，则使用 200  $\mu\text{L}$  细胞悬液、50  $\mu\text{L}$  Cocktail 抗体、300  $\mu\text{L}$  Buffer I、50  $\mu\text{L}$  SA 磁珠、2.4 mL Buffer II。

| 起始细胞数           | 细胞悬液体积            | Cocktail 抗体       | Buffer I          | SA 磁珠             | Buffer II         | 磁吸前总体积            |
|-----------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| $1 \times 10^6$ | 40 $\mu\text{L}$  | 10 $\mu\text{L}$  | 60 $\mu\text{L}$  | 10 $\mu\text{L}$  | 480 $\mu\text{L}$ | 600 $\mu\text{L}$ |
| $2 \times 10^6$ | 80 $\mu\text{L}$  | 20 $\mu\text{L}$  | 120 $\mu\text{L}$ | 20 $\mu\text{L}$  | 960 $\mu\text{L}$ | 1.2 mL            |
| $5 \times 10^6$ | 200 $\mu\text{L}$ | 50 $\mu\text{L}$  | 300 $\mu\text{L}$ | 50 $\mu\text{L}$  | 2.4 mL            | 3.0 mL            |
| $1 \times 10^7$ | 400 $\mu\text{L}$ | 100 $\mu\text{L}$ | 600 $\mu\text{L}$ | 100 $\mu\text{L}$ | 4.8 mL            | 6.0 mL            |
| $5 \times 10^7$ | 2.0 mL            | 500 $\mu\text{L}$ | 3.0 mL            | 500 $\mu\text{L}$ | 24 mL             | 30 mL             |
| $1 \times 10^8$ | 4.0 mL            | 1.0 mL            | 6.0 mL            | 1.0 mL            | 48 mL             | 60 mL             |

## 8. 结果判读与检测建议

| 项目    | 说明                                                                        |
|-------|---------------------------------------------------------------------------|
| 最终收集物 | 第二次磁吸后的上清为富集后的人 CD4 T 细胞，主要为 CD3 $^{+}$ CD4 $^{+}$ T 细胞。                  |
| 被去除细胞 | 被 Cocktail 抗体标记并与 SA 磁珠结合的非目标细胞。                                          |
| 检测方式  | 建议用 CD45、CD3、CD4、CD8 等抗体检测纯度；也可根据实验目的加入 CD14、CD16、CD19、CD56、CD11b 等排除性标记。 |
| 纯度计算  | 建议在单细胞、活细胞、CD45 $^{+}$ 门内统计目标 T 细胞比例。                                     |

## 9. 注意事项

- 10M 表示 10 million cells，即  $1 \times 10^6$  cells；本说明书标准反应单位为 40  $\mu\text{L}$  细胞悬液含  $1 \times 10^6$  cells。
- Cocktail 抗体孵育建议在 2–8  $^{\circ}\text{C}$  进行；SA 磁珠孵育按本说明书在室温进行。
- 加入 SA 磁珠前应充分重悬磁珠；加样后轻柔混匀，避免局部磁珠浓度过高。
- 加入 60  $\mu\text{L}$  Buffer I 和 480  $\mu\text{L}$  Buffer II 后均需轻柔混匀；若细胞数增加，两次 Buffer 体积必须同步增加。
- 第一次磁吸后转移上清时，枪头不要接触磁珠沉积区。第二次磁吸可进一步降低游离磁珠和残留被标记细胞。
- 若处理细胞数较大，建议分管操作，避免管内液面过高或磁吸距离过大导致去除不充分。
- 细胞团块、死细胞、红细胞、血小板残留或样本黏稠会影响阴选纯度和回收率，建议分选前充分过滤并准确计数。

## 10. 常见问题排查

| 问题       | 可能原因                            | 建议处理                                                          |
|----------|---------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| 纯度偏低     | 非目标细胞标记不足、磁珠未充分重悬、磁吸时间不足或样本含团块。 | 确认 Cocktail、SA 磁珠和两次 Buffer 已按细胞数等比例增加；充分混匀磁珠；过滤细胞悬液；必要时分管操作。 |
| 回收率偏低    | 细胞团聚、过度吹打、磁吸时扰动目标细胞或吸走沉积区细胞。    | 降低机械损伤；轻柔移液；转移上清时避开磁珠沉积区；保证 Buffer 中含蛋白保护组分。                  |
| 上清残留磁珠   | 第一次磁吸后转移时带入磁珠。                  | 严格执行第二次 2 min 磁吸；取上清时保留少量液体不吸尽。                               |
| 不同批次结果波动 | 样本来源、血小板/红细胞残留、死细胞比例或计数误差差异。    | 统一样本处理流程；记录起始细胞数、活率、细胞浓度和实际加样体积。                              |