

链霉亲和素分选磁珠 (92-01-0025)

[组分] 2 mL 链霉亲和素磁珠：与链霉亲和素偶联的磁珠。

[规格] 2mL, 可分选 2×10^9 总细胞数, 多达 200 次分选。

[保存形式] 保存在含有稳定剂和 0.05%叠氮钠的溶液中。

[储存条件] 在 2—8°C 条件下避光保存, 请勿冻存。有效期见瓶子标签。

[分选原理]

首先, 用生物素偶联的一抗或其配体对细胞进行染色。随后, 用链霉亲和素磁珠对细胞进行磁性标记。然后将细胞悬液加载到分选柱上, 该分选柱置于分选器的磁场中。磁性标记的细胞保留在柱中, 而未标记的细胞则通过。将分选柱从磁场中移开后, 磁性标记的细胞可以作为正选细胞被洗脱下来。

[试剂和设备]

● 标记缓冲液：制备含有磷酸盐缓冲盐水(PBS) pH 7.2 的溶液, 辅以 2 mM EDTA, 还可以选择辅以 0.5%不含生物素的牛血清白蛋白(BSA)。保持缓冲液低温 (2–8 °C)。使用前对缓冲液进行脱气, 因为气泡可能会堵塞分选柱。

▲ 对于磁性标记, 应使用不含生物素的标记缓冲液, 例如不含 BSA 的缓冲液或添加了不含生物素的 BSA 的缓冲液。

如果 BSA 制剂被生物素污染, 游离生物素会与生物素化抗体竞争与链霉亲和素微珠的结合。也不建议使用细胞培养基, 因为它可能含有游离生物素。

● 分选缓冲液：含有 pH7.2、0.5%BSA 和 2mM EDTA 的溶液。保持缓冲液冷却状态(2–8°C)。

▲EDTA 可以被其他取代, 如抗凝柠檬酸葡萄糖配方 A(ACD-A)或柠檬酸磷酸葡萄糖(CPD)。BSA 可以被其他蛋白质取代, 如人血清白蛋白、人血清或胎牛血清。不建议使用含有钙离子或镁离子的缓冲液或培养基。

● 分选柱和分选器：链霉亲和素磁珠标记的细胞可通过 xM、xL 柱(阳性选择)进行富集。也可以使用自动分选器进行阳性选择。

- 生物素化的一抗或配体。
- (可选)PI(碘化丙啶)或 7-AAD 用于流式细胞术排除死亡细胞。
- (可选)用于去除细胞团的预分离过滤器。
- (可选) 死细胞去除试剂盒，用于去除死细胞。

[1. 样本制备]

当使用抗凝外周血或白膜层时，应通过密度梯度离心分离外周血单个核细胞 (PBMC)。

▲ 注意:要在密度梯度分离后去除血小板, 请将细胞沉淀重悬于缓冲液中, 并在 20°C 下以 200×g 离心 10–15 分钟。小心吸出上清液。重复洗涤步骤。

当处理组织时，使用标准方法制备单细胞悬浮液。

▲注: 死亡细胞可能非特异性地结合到磁珠上。要去除死细胞, 我们建议使用密度梯度离心法或死细胞去除试剂盒。

[2. 磁性标记]

▲过程操作速度要快，试剂需提前预冷。可以减少非特异性细胞标记。

▲磁性标记的体积最多可达 10^7 个细胞。少于 10^7 个细胞时，请使用标示的相同体积。当处理更多的细胞时，相应地放大所有试剂体积 (例如，对于 2×10^7 个总细胞，使用标示试剂体积的两倍)。

▲为了获得最佳性能，在磁分选之前获得单细胞悬液是很重要的。通过预分离过滤器去除可能堵塞分选柱的细胞团块。

▲ 以下提到的离心力和离心时间是建议值。最佳相对离心力 (RCF) 和离心时间可能因细胞样品而异。

1. 细胞计数。
2. 细胞离心，300g，10min，去除上清。
3. 根据说明书建议重悬细胞沉淀并用生物素化抗体进行染色。

▲ 注意：生物素化抗体应以其最佳滴度使用，即具有最佳标记强度。

4. 充分混合并在冰箱 (2–8 °C) 中避光孵育 10 分钟或按照说明书的建议进行。

5. 每 10^7 细胞添加 1–2 mL 缓冲液, 洗涤细胞以去除未结合的一抗, 并以 $300\times g$ 离心 10 分钟。
6. (可选) 重复清洗步骤。
7. 完全吸出上清液, 每 10^7 个总细胞加 90 μL 缓冲液重悬细胞沉淀。
8. 每 10^7 总细胞添加 10 μL 链霉亲和素磁珠。
9. 充分混合并在冰箱 ($2-8^\circ\text{C}$) 中孵育 15 分钟。
▲在冰上工作需要增加孵育时间。较高的温度和/或较长的孵育时间会导致非特异性细胞标记。
10. 每 10^7 细胞添加 1–2 mL 缓冲液洗涤细胞, 并以 $300\times g$ 离心 10 分钟。
11. 完全吸出上清液。
12. 加 500 μL 缓冲液中重悬细胞。
▲处理更多细胞数时, 请相应地增加缓冲液用量。
13. 进行磁分选。

[3. 磁性分选]

- ▲ 根据总细胞数和标记细胞数选择合适的分选柱和分选器。**

1. 将分选柱放置在分选器的磁场中。
2. 将分选柱中加入适量缓冲液, 充分湿润分选柱:

xM: 500 μL xL: 3 mL

3. 将细胞悬液加到分选柱中。

4. 结合磁珠的细胞会被吸附到分选柱上, 没有结合的细胞会顺着液体流下来。加适量的缓冲液, 待液体全部流尽, 再加入适量缓冲液, 一共洗 3 次。收集总流出物。这是未标记的细胞。

xM: $3\times 500 \mu\text{L}$ xL: $3\times 3 \text{ mL}$

5. 将分选柱从分选器中取出, 并将其放在合适的收集管上。
6. 加适量的缓冲液到分选柱中, 迅速用塞子推下, 得到就是磁性标记的细胞。

xM: 1 mL xL: 5 mL