

抗FITC分选磁珠 (92-01-0028)

[组分] 2 mL 抗 FITC 磁珠：与单克隆抗 FITC Isomer-1 抗体（同种型：小鼠 IgG1）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。有效期见试剂外标签。

[分选原理]

首先，用 FITC 偶联的一抗或其配体对细胞进行染色。随后，用抗 FITC 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]

● 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)。

▲注：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：抗 FITC 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。

● FITC 偶联的一抗或配体。

▲ 注意：仅使用与 FITC Isomer-1 偶联的抗体。

● (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) 预分离过滤器用于去除细胞团块。

● (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：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，请使用标示的相同试剂体积。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。

▲ FITC 偶联一抗应做滴定实验以确定最佳染色稀释度。

1. 细胞计数。
2. 300×g 离心 10 分钟，去除上清。
3. 根据说明书建议重悬细胞沉淀并用 FITC 偶联一抗进行染色。
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×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 μ L 缓冲液重悬细胞沉淀。
8. 每 10^7 总细胞添加 10 μ L 抗 FITC 磁珠。

▲ 注意：用于实现最佳磁力分选的抗 FITC 磁珠浓度取决于 FIT 偶联抗体染色的强度以及细胞悬液中靶细胞的含量。FITC 染色较淡的靶细胞需要更高浓度的抗 FITC 磁珠才能实现最佳的磁性标记和分选。

9. 充分混合并在冰箱 (2–8 °C) 中孵育 15 分钟。
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 μ L 缓冲液中重悬细胞，最多重悬 10^8 个细胞。

▲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 μ L 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: $3\times 500 \mu$ L xL: 3×3 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