

## 抗APC分选磁珠 (92-01-0056)

**[组分]** 2 mL 抗 APC 磁珠：与单克隆小鼠抗 APC 抗体（同种型：小鼠 IgG1）偶联的磁珠。

**[规格]** 2mL, 可分选  $10^9$  总细胞数, 多达 100 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。有效期见瓶子外标签。

### [分选原理]

首先, 用 APC 偶联的一抗或其配体对细胞进行染色。随后, 用抗 APC 磁珠对细胞进行磁性标记。然后将细胞悬液加到分选柱上, 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分选柱流出。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 APC 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。

● APC 偶联的一抗或配体。

● (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) 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。

当处理组织或溶解的血液时，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  $2 \times 10^7$  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。

▲ 建议的孵育温度为 2–8 °C。在冰上工作可能需要增加孵育时间。较高的温度和/或较长的孵育时间可能会导致非特异性细胞标记。

▲ 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。

▲ APC 偶联一抗应做滴定实验以确定最佳染色稀释度，以获得靶细胞的最佳标记强度。

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 APC 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 80 μL 缓冲液重悬细胞沉淀。
8. 每  $10^7$  总细胞添加 20 μL 抗 APC 磁珠。

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  $\mu\text{L}$  缓冲液中重悬细胞，最多重悬  $10^8$  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  $\mu\text{L}$                       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:  $3\times 500 \mu\text{L}$                       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