

CD19磁珠试剂盒，人(92-01-0335)

- [组分]** 1 mL REAlease CD19-生物素，人
5 mL REAlease 抗生物素磁珠（CD19，人）
4 mL REAlease 磁珠释放试剂（50×）
4 mL REAlease 释放试剂
4 mL REAlease 终止试剂。

[规格] 可分选 10^9 总细胞数，多达 100 次分选。

[保存形式] RElease 终止试剂保存在 在含有 0.05% 叠氮化钠的缓冲液中，其他组分均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 REAlease CD19-生物素（REAleas 生物素复合物）标记外周血单核细胞（PBMC）中的靶细胞。随后，REAlease 抗生物素磁珠（CD19，人）与 RElease 生物素复合物结合。

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内。未标记的非靶细胞流过。从磁场中取出分选柱后，使用 RElease 磁珠释放试剂洗脱目标细胞，同时从细胞中去除磁珠。最后，在与 REAlease 释放试剂一起孵育的过程中，REAlease 生物素复合物解体并从细胞表面解离，使细胞不含所有标记物。

[试剂和设备]

- 缓冲液：含有 pH7.2、0.5%BSA 和 2mM EDTA 的溶液。

▲ 注：BSA 可以用其他蛋白质替代，如人血清白蛋白、人血清或胎牛血清 (FBS)。不建议使用含有 Ca^{2+} 或 Mg^{2+} 的缓冲液或培养基。

- 选择合适的分选柱和分选器。

REAl ease 磁珠释放试剂： 1:50 稀释的 REAl ease 磁珠释放试剂(50×)，例如，将 20 μL REAl ease 磁珠释放试剂(50×)添加到 980 μL 缓冲液中。

▲使用当天新鲜配制的缓冲液。室温保存。

▲每个 xM 柱准备 1 mL，每个 xL 柱准备 5 mL。

- (可选) 预分离过滤器用于去除细胞团块。
- (可选)用于流式细胞术分析的荧光标记抗体。
- (可选)碘化丙啶溶液或 7-AAD 用于流式细胞术排除死亡细胞。

[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 PBMC。

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

▲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]

▲ 建议的孵育温度为室温 (+19 °C 至 +25 °C) 。

▲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。

1. 细胞计数。
2. $300g$ 离心 10min，去除上清。
3. 每 10^7 细胞，用 40 μL 缓冲液重悬。

4. 每 10^7 细胞，用 10 μ L RElease CD19-生物素。
5. 混匀后避光孵育 5min。
6. 每 10^7 细胞加入 50 μ L RElease 抗生物素磁珠（CD19，人）。
7. 混合均匀，孵育 5 分钟。
8. (可选)加入染色抗体，在冰箱(2-8°C)避光孵育 5 分钟。

▲ 注意：这些染色抗体无法从细胞中去除。

9. 加 500 μ l 缓冲液重悬细胞，总细胞数量不超过 5×10^7 个。

[3. 磁性分选并去除磁性标记]

▲ 根据总细胞数和标记细胞数选择合适的分选柱和分选器。

▲ 建议的孵育温度为室温 (+19 °C 至 +25 °C) 。

1. 将分选柱放置在分选器的磁场中。
2. 在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。将适量的 RElease 磁珠释放试剂（由 RElease 磁珠释放试剂 (50 \times) 配制) 加到分选柱上。通过将柱塞牢牢地推入柱中，立即将冲洗出靶细胞。

xM: 1 mL xL: 5 mL

6. 充分混合并孵育 10 分钟。
7. 细胞现在不含磁珠，可用于分析和下游应用。

【4.去除 RElease 复合物并使用 RElease 磁珠进行第二次磁性标记】

▲建议的孵育温度为室温 (+19 °C 至 +25 °C) 。

▲若使用抗生素磁珠进行第二次标记，请继续执行以下操作。

【4.1 去除 RElease 复合物】

1. 去除 RElease 复合物，300g 离心 10min，去除上清。
2. 用适当的缓冲液重悬。

xM: 1mL xL: 5mL

3. 添加适当的 RElease 释放试剂。

xM: 20 μ L xL: 100 μ L

4. 充分混匀并孵育 5 分钟。
5. 细胞现在不含 RElease 复合物以及磁珠，可用于分析和下游应用。
6. (可选) 对于使用 RElease 磁珠进行第二次磁性标记的，请继续以下操作。

【4.2 使用 RElease 磁珠进行二次磁性标记】

1. 将细胞悬液 300 \times g 离心 10 分钟，去上清。
2. 每 10⁷ 细胞加入 40 μ L RElease 终止试剂重悬。
3. 混匀。
4. 重复[2. 磁性标记] 中步骤 4-9 进行磁性标记。

▲为获得最佳的细胞回收率和纯度，第二次标记的磁珠的量可能需要优化，因为目标细胞的起始数量不同。

【4.3 (可选) 使用分选磁珠进行第二次磁性标记】

▲ 使用抗生物素磁珠进行第二次磁性分选，请继续执行去除 RElease 复合物并使用 RElease 磁珠进行第二次磁性标记的所有步骤。

1. 300 \times g 离心细胞悬液 10 分钟。完全吸出上清液。
2. 添加说明书推荐的分选磁珠用量，以磁性方式标记细胞作为第二个标记过程。

▲为获得最佳的细胞回收率和纯度，第二次标记的磁珠的量可能需要优化，因为目标细胞的起始数量不同。