

CD11b分选磁珠，人，小鼠(92-01-0032)

[组分]

人和小鼠 CD11b 磁珠：与大鼠抗小鼠/人 CD11b 单克隆 (Mac-1 α) 抗体 (同型：大鼠 IgG2b；克隆号：M1 / 70.15.11.5) 偶联的磁珠

[规格] 2 mL，可分选 10^9 个人源细胞总量，多达 100 次分离；可分选 2×10^9 个小鼠源细胞总量，多达 200 次分离。

[保存形式] CD11b 磁珠储存在含有稳定剂和 0.05% 叠氮化钠的缓冲液中。

[储存条件] 4 - 8 °C 避光保存，请勿冷冻。有效期见试剂外标签。

[分选原理]

首先，用 CD11b 磁珠对 CD11b+ 细胞进行磁性标记。然后，将细胞悬浮液装入置于分选器磁场的柱中。磁性标记的 CD11b+ 细胞被保留在柱中，未标记的细胞顺着分选柱流出。将柱从磁场中移出后，磁性保留的 CD11b+ 细胞可作为正选细胞部分被洗脱出来。

[背景信息]

CD11b 磁珠用于分选表达 CD11b 抗原的人/小鼠细胞。CD11b 在人髓样细胞上大量表达，而在 NK 细胞和一些活化的淋巴细胞上却弱表达。在小鼠中，CD11b 抗原在单核细胞/巨噬细胞上表达，并在粒细胞，NK 细胞，CD5 + B1 细胞和部分树突细胞中表达较低。

CD11b (Mac-1 α ; 整合素 α M 链) 抗体与 CD11b/CD18 异源二聚体 (Mac-1, α M β 2 integrin) 的 170 kDa α M 亚基发生反应。它是补体 (C3bi)、纤维蛋白原或凝血因子 X 的受体。

[试剂和仪器要求]

● 缓冲液 (脱气) : 配制含有 pH7.2 PBS、0.5% 牛血清白蛋白 (BSA) 和 2 mM EDTA 的溶液。
将缓冲液置于 4-8 °C。

▲ 注: EDTA 可由其他补充剂替代, 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 可以用其他蛋白质代替, 例如明胶、小鼠/人血清或胎牛血清。不建议使用含有 Ca^{2+} 或 Mg^{2+} 的缓冲液或培养基。

- 分选柱和分离器: 单核细胞和巨噬细胞可以用 xM、xL 分选柱富集或去除。
- (可选) 荧光偶联的 CD11b 抗体用于流式分析。
- (可选) PI 或 7-AAD 可以用于流式分析中排除死细胞。
- (可选) 预分离过滤器去除细胞团块。

[步骤]

一、样本准备

人单个核细胞样本的准备

在处理抗凝外周血或白膜层时, 应使用密度梯度离心法分离外周血单个核细胞 (PBMC) 。

▲ 注: 密度梯度分离后除去血小板, 将细胞重悬于缓冲液中, 在 200 \times g 下 20°C 离心 10-15 分钟。小心抽吸上清。重复洗涤步骤。

小鼠组织样本的准备

当处理组织或溶血时，使用标准方法制备单细胞悬浮液。

▲注：死细胞可能与磁珠非特异性结合。为了去除死细胞，我们建议使用密度梯度离心或死细胞去除试剂盒。

二、人单个核细胞的磁珠标记

▲ 快速工作，保持细胞低温，并使用预冷溶液，可以减少细胞的非特异性标记。

▲ 下面给出的磁珠标记规模为 10^7 个细胞总量。当处理少于 10^7 个细胞时，使用与指示相同的试剂体积。当处理较高的细胞数时，相应地扩大所有试剂体积和总体积(例如，对于 2×10^7 总细胞，使用所有指示试剂体积和总体积的两倍体积)。

▲ 为了获得最佳性能，在磁标记之前获得单细胞悬浮液是很重要的。将细胞通过 $30 \mu\text{m}$ 尼龙网，去除可能堵塞分选柱的细胞团块。

1. 细胞计数。
2. $300 \times g$ 离心 10 分钟。去除上清。
3. 每 10^7 个细胞总量使用 $80 \mu\text{L}$ 缓冲液重悬。
4. 每 10^7 个细胞总量添加 $20 \mu\text{L}$ CD11b 磁珠。
5. 混匀， $4-8^\circ\text{C}$ 孵育 15 分钟。

▲ 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导致非特异性细胞标记。

6. (可选) 添加染色抗体，例如： $10 \mu\text{L}$ CD11b-FITC $4-8^\circ\text{C}$ 避光孵育 5 分钟。
7. 每 10^7 个细胞加入 $1-2 \text{ mL}$ 缓冲液洗涤细胞， $300 \times g$ 离心 10 分钟，去上清。

8. 用 500 μL 缓冲液重悬最多 10^8 个细胞。

▲ 注：细胞数量增多需相应地增加缓冲液的体积。

9. 进行细胞分选步骤。

三、小鼠细胞的磁珠标记

▲ 快速工作，保持细胞低温，并使用预冷溶液，可以减少细胞的非特异性标记。

▲ 下面给出的磁珠标记规模为 10^7 个细胞总量。当处理少于 10^7 个细胞时，使用与指示相同的试剂体积。当处理较高的细胞数时，相应地扩大所有试剂体积和总体积(例如，对于 2×10^7 总细胞，使用所有指示试剂体积和总体积的两倍体积)。

▲ 为了获得最佳性能，在磁标记之前获得单细胞悬浮液是很重要的。将细胞通过 30 μm 尼龙网，去除可能堵塞分选柱的细胞团块。

1. 细胞计数。

2. 300 \times g 离心 10 分钟。去除上清。

3. 每 10^7 个细胞总量使用 90 μL 缓冲液重悬。

4. 每 10^7 个细胞总量添加 10 μL CD11b 磁珠。

5. 混匀，4-8 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 分钟。

▲ 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导致非特异性细胞标记。

6. (可选) 添加染色抗体，例如：10 μL CD11b-FITC 4-8 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 5 分钟。

7. 每 10^7 个细胞加入 1-2 mL 缓冲液洗涤细胞，300 \times g 离心 10 分钟，去上清。

8. 用 500 μL 缓冲液重悬最多 10^8 个细胞。

▲ 注：细胞数量增多需相应地增加缓冲液的体积。

9. 进行细胞分选步骤。

四、细胞分选

▲ 根据总细胞数和 CD11b+细胞数选择合适的分选柱和分离器。

xM 或 xL 分选柱进行细胞分选

1. 将分选柱置于相对应的分选器中。

2. 用适当体积的缓冲液润洗分选柱：

xM: 500 μ L

xL: 3 mL

3. 将细胞悬液转移至分选柱中。

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 μ L

xL: 3 \times 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，得到就是目的细胞。

xM: 1 mL

xL: 5 mL

▲ (可选)为了提高 CD11b+细胞的纯度，洗脱的部分可以在第二个 xM 或 xL 柱上富集。用新的分选柱重复步骤 1 至 6 中描述的磁分选过程。