

## Ter-119分选磁珠，小鼠(92-01-0033)

### [组分]

2 mL 小鼠-Ter-119 磁珠：与抗小鼠 Ter-119（Ter-119；同种型：大鼠 IgG2b）单克隆抗体偶联的磁珠。

**[规格]** 2 mL，可分选  $2 \times 10^9$  个细胞总量，多达 200 次分离。

**[保存形式]** 抗 Ter-119 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，用抗 Ter-119 磁珠对 Ter-119+ 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 Ter-119+ 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 Ter-119+ 细胞可作为正选细胞部分被洗脱出来。

### [背景信息]

基于 Ter-119 抗原的表达，开发了 Anti-Ter-119 磁珠用于细胞分离。Ter-119 在成熟红细胞和红细胞前体细胞上表达，它在淋巴细胞和髓细胞上不表达。

### [试剂和仪器要求]

- 缓冲液（脱气）： 配制含有 pH 7.2 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、小鼠血清或胎牛血清。不建议使用含有  $\text{Ca}^{2+}$  或  $\text{Mg}^{2+}$  的缓冲液或培养基。

- 分选柱和分选器: Ter-119 阳性细胞可以用 xM、 xL 分选柱富集。强烈表达 Ter-119 抗原的细胞也可以用 xM、 xL 分选柱去除。

- (可选) 荧光偶联的 Ter-119 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

当处理淋巴器官、非淋巴组织或外周血时,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、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  $2 \times 10^7$  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  $90 \mu\text{L}$  缓冲液重悬。
4. 每  $10^7$  个细胞总量添加  $10 \mu\text{L}$  抗 Ter-119 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) 根据说明书推荐添加 Ter-119 荧光抗体， $4-8^\circ\text{C}$  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  $500 \mu\text{L}$  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、细胞分选

▲ 根据总细胞数和 Ter-119+细胞数选择合适的分选柱和分选器。

**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  $\mu$ 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  $\mu$ 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 Ter-119+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。