

## 嗜酸性粒细胞分选试剂盒，人(92-01-0079)

### [组分]

1 mL 生物素标记人嗜酸性粒细胞抗体混合物：针对 CD2，CD14，CD16，CD19，CD56，CD123 和 CD235a（糖蛋白 A）的生物素标记单克隆抗体混合物。

2 mL 抗生物素磁珠：与抗生物素单克隆抗体（同型：小鼠 IgG1）偶联的磁珠。

[规格] 可分选  $10^9$  个细胞总量，多达 100 次分离。

[保存形式] 所有组分均储存在含有稳定剂和 0.05% 叠氮化钠的缓冲液中。

[储存条件]  $2 - 8^{\circ}\text{C}$  避光保存，请勿冷冻。有效期见试剂外标签。

### [分选原理]

使用嗜酸性粒细胞分选试剂盒，可通过去除非嗜酸性粒细胞（未接触分离）来分离人嗜酸性粒细胞。非嗜酸性粒细胞用生物素结合的单克隆抗体混合物（作为一级标记试剂）和与磁珠偶联的抗生物素单克隆抗体（作为二级标记试剂）进行间接磁性标记。两个标记步骤之间无需清洗步骤。磁性标记的非嗜酸性粒细胞在分选器的磁场中被保留在分选柱上，而未标记的嗜酸性粒细胞则通过分选柱流出。

### [背景信息]

嗜酸性粒细胞参与先天性和适应性免疫。它们在对各种病理状况（如寄生虫感染、哮喘和胃肠道疾病）的免疫反应中发挥作用。嗜酸性粒细胞的特征在于含有多种细胞毒性蛋白（如主要碱性蛋白 MBP）和核糖核酸酶的颗粒。嗜酸性粒细胞通过释放这些预先形成的分子以及各种细胞因子、趋化因子、脂

质介质和神经调节剂发挥作用。它们会在组织损伤、感染、过敏原和肿瘤等多种刺激下被激活。嗜酸性粒细胞与其他各种免疫细胞相互作用，例如，通过充当抗原呈递细胞来刺激 T 细胞。嗜酸性粒细胞还能通过释放 MBP 激活肥大细胞。

### [试剂和仪器要求]

- 缓冲液： 配制含有 pH7.2 PBS、0.5% 牛血清白蛋白（BSA）和 2mMEDTA 的溶液。将缓冲液置于 2-8 °C。使用前对缓冲液进行脱气处理，因为空气气泡可能会堵塞分选柱。
- ▲ 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,例如人血清白蛋白、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。
- 红细胞裂解液。
- Ficoll-Paque。
- (可选) 荧光偶联的抗体用于流式分析。
- (可选) PI 或 7-AAD 可以用于流式分析中排除死细胞。
- (可选) 死细胞清除试剂盒用于死细胞的清除。
- (可选) 预分离过滤器去除细胞团块。

### [步骤]

#### 一、样本准备

1. 使用经过抗凝剂（如肝素、柠檬酸盐、ACD-A 或柠檬酸磷酸葡萄糖（CPD））处理的新鲜人血，或使用不超过 8 小时的富含白细胞的白膜层。
2. 加入一体积含 2 mM EDTA 或 0.6% ACD-A 的 PBS 稀释细胞。
3. 在 50 mL 锥形离心管中将 20 mL 稀释过的细胞悬浮液小心地覆盖在 20 mL Ficoll-Paque ( $\rho = 1.077 \text{ g/mL}$ ) 上，然后在 20 °C 下于无制动器的离心机中以 600 $\times$ g 离心 30 分钟。
4. 小心移除并丢弃血浆，取出在血浆：Ficoll 和 Ficoll- Paque 界面形成一层的单核细胞，留下的红细胞颗粒不受干扰。
5. 用 1 $\times$  红细胞裂解液重悬红细胞颗粒，并将裂解液注入整个 50 mL 离心管中。
6. 室温（19-25 °C）下孵育 10 分钟。
7. 在 20 °C 下以 300 $\times$ g 离心 8 分钟。小心去除上清液。
8. 加入 50 mL 缓冲液清洗细胞。

注意：死细胞可能与磁珠非特异性结合。要去除死细胞，建议使用死细胞去除试剂盒。

## 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。使用前用缓冲液湿润过滤器。

▲ 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。

1. 细胞计数。
2. 300×g 离心 10 分钟。去除上清。
3. 每  $10^7$  个细胞总量使用 40  $\mu\text{L}$  缓冲液重悬。
4. 每  $10^7$  个细胞总量添加 10  $\mu\text{L}$  生物素抗体混合物。
5. 混匀，2-8 °C 孵育 10 分钟。
6. 每  $10^7$  个细胞总量使用 30  $\mu\text{L}$  缓冲液。
7. 每  $10^7$  个细胞总量添加 20  $\mu\text{L}$  抗生物素磁珠。
8. 混匀，2-8 °C 孵育 15 分钟。
9. 加入 1-2 mL 缓冲液洗涤细胞，300×g 离心 10 分钟，去上清。
10. 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。

11. 进行细胞分选步骤。

### 三、细胞分选

▲ 根据总细胞数和标记的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  $\mu\text{L}$

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: 3×500 μL

xL: 3×3 mL

5. (可选) 移除磁场洗脱滞留的细胞，这部分代表的是非嗜酸性粒细胞。