

ACSA-2分选磁珠试剂盒，小鼠(92-01-0145)

[组分]

与抗 ACSA-2 单克隆抗体偶联的磁珠(同种型:大鼠 IgG2b)和 FcR 阻断试剂，小鼠

1 mL 抗 ACSA-2 磁珠，小鼠和 1 mL FcR 阻断试剂，小鼠。

[规格] 可分选 10^9 个细胞总量，多达 100 次分离。

[保存形式] 所有试剂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]

首先，用 FcR 阻断试剂阻断小鼠 Fc 受体。然后，用 Anti-ACSA-2 磁珠对 ACSA-2+细胞进行磁性标记。分选柱放置在分选器的磁场中，将细胞悬浮液装载到分选柱上。磁性标记的 ACSA-2+细胞保留在柱内，未标记的细胞穿过。将分选柱移出磁场后，磁性保留的 ACSA-2+细胞可以作为正选择的细胞部分被洗脱。为了提高纯度，含有 ACSA-2+细胞的阳性分选部分可以在第二个分选柱上分离。

[背景信息]

抗 ACSA-2 磁珠(ACSA-2:星形胶质细胞表面抗原-2)是基于 ACSA-2 抗原的表达而开发的，用于从小鼠神经组织细胞悬液中分离星形胶质细胞。

ACSA-2 抗原在星形胶质细胞上的特异性表达模式与 GLAST 相似。因此，ACSA-2 是中枢神经系统 (CNS) 星形胶质细胞的特异性标志物。ACSA-2+ 星形胶质细胞的百分比根据小鼠年龄和用于细胞分离的脑区域而不同。

抗 ACSA-2 磁珠可以分离所有小鼠年龄阶段的星形胶质细胞。

[试剂和仪器要求]

● 缓冲液： 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 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： BSA 可以用其他蛋白质代替，例如小鼠血清白蛋白、小鼠血清或胎牛血清。

▲ 注： 始终使用新鲜配制的缓冲液。不要使用运行缓冲液，因为它们含有少量叠氮化钠，可能会影响结果。

● 神经组织分离试剂盒(P)

● 成人脑分离试剂盒用于 P7 以上的啮齿动物。

● 预分离过滤器去除细胞团块。

● 分选柱和分选器： ACSA-2+ 细胞可以用 xM、xL 分选柱富集。

● (可选) 荧光偶联的 ACSA-2 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) 组织解离器。

[步骤]

一、样本准备

神经组织单细胞悬液的制备请参考神经组织解离试剂盒(P)或成人脑解离试剂盒的说明书, 该试剂盒可与组织解离器联合使用。

▲注:如果其他细胞表面表位对木瓜蛋白酶敏感, 则可以使用神经组织解离试剂盒(T)。

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。为了获得最佳性能, 建议至少使用 5×10^6 个细胞数。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 $70 \mu\text{m}$ 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. $300 \times g$ 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 $10 \mu\text{L}$ FcR 阻断剂。

5. 混匀, 不要涡旋。2–8 °C 孵育 10 分钟。

6. 每 10^7 个细胞总量添加 $10 \mu\text{L}$ 抗 ACSA-2 磁珠。

7. 混匀，不要涡旋。2-8 °C 孵育 15 分钟。
8. 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。
9. 用 500 μL 缓冲液重悬最多 10^7 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 ACSA-2+ 细胞数选择合适的分选柱和分选器。

▲ 始终等到分选柱储液器排空后再进行下一步操作。

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 μL xL: 3 mL
3. 将细胞悬液转移至分选柱中。收集包含未标记细胞的流出液。
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，和第三步流出物混合，这是 ACSA-2 阴性细胞部分。

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，得到就是目的细胞。

xM: 1 mL xL: 5 mL

7. (可选)为了提高 ACSA-2+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。