

## 单核细胞分选试剂盒（骨髓），小鼠(92-01-0152)

### [组分]

1 mL 小鼠单核细胞生物素抗体混合物：生物素偶联单克隆抗体混合物

2 mL 抗生物素磁珠：与生物素单克隆抗体（同种型：小鼠 IgG1）偶联的磁珠

1 mL 小鼠 FcR 阻断剂

[规格] 可分选  $10^9$  个细胞总量，多达 20 次分离。

[保存形式] 所有组分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]

使用小鼠单核细胞分选试剂盒（BM）可通过去除非目的细胞来分选获得单核细胞。用生物素结合的单克隆抗体混合物（作为一级标记试剂）和抗生物素单克隆抗体结合的磁珠（作为二级标记试剂）对非目的细胞进行间接磁性标记。磁性标记的非目的细胞在分离器的磁场中保留在分选柱中，而未标记的单核细胞则通过分选柱。

### [背景信息]

单核细胞分选试剂盒被用于从小鼠骨髓悬浮液中分离单核细胞。高纯度单核细胞的分离是通过去除磁性标记的非目的细胞，即 T 细胞、B 细胞、NK 细胞、树突状细胞、红细胞和粒细胞来实现的。

## [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 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: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,例如小鼠血清白蛋白、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。
- 分选柱和分离器。
- (可选) 荧光偶联的抗体用于流式分析, 例如 CD115-PE、CD11b-VioBlue、CD3 $\epsilon$ -PE、CD45R (B220)、Anti-NK1.1-PE、Anti-Ly-6G-PE、CD49b-PE、Anti-Ly-6C-FITC、Anti-Siglec-F-APC。
- (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

当处理组织时, 使用标准方法制备单细胞悬浮液。

#### 骨髓细胞的制备

▲ 所有的步骤都应该在冰上进行。

1. 使用注射器和 26G 针头, 用缓冲液冲洗股骨 (和胫骨) , 收集小鼠骨髓细胞。
2. 用移液管轻轻地将细胞吹打几次。

3. 将细胞通过 30  $\mu\text{m}$  尼龙网（预分离过滤器，30  $\mu\text{m}$ ），以去除可能堵塞分选柱的细胞团块。使用前用缓冲液浸湿过滤器。
4. 加入缓冲液清洗细胞，在 2-8  $^{\circ}\text{C}$  下 300 $\times$ g 离心 10 分钟。完全吸出上清液。
5. 用缓冲液重悬细胞团，取等分细胞计数。

## 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  $5 \times 10^7$  个细胞总量。当处理少于  $5 \times 10^7$  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  $10^8$  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 $\times$ g 离心 10 分钟。去除上清。
  3. 每  $5 \times 10^7$  个细胞总量使用 175  $\mu\text{L}$  缓冲液重悬。
  4. 添加 25  $\mu\text{L}$  FcR 阻断剂，混匀。
  5. 每  $5 \times 10^7$  个细胞总量添加 50  $\mu\text{L}$  单核细胞生物素抗体混合物。
  6. 混匀，2-8  $^{\circ}\text{C}$  孵育 5 分钟。
  7. 每  $5 \times 10^7$  个细胞加入 10 mL 缓冲液洗涤细胞，300 $\times$ g 离心 10 分钟，去上清。

8. 每  $5 \times 10^7$  个细胞用 400  $\mu\text{L}$  缓冲液重悬。
9. 每  $5 \times 10^7$  个细胞添加 100  $\mu\text{L}$  抗生物素磁珠。
10. 混匀，2-8°C 孵育 10 分钟。
11. 进行细胞分选步骤。

### 三、细胞分选

- ▲ 根据总细胞数和磁珠标记的非目的细胞数选择合适的分选柱和分离器。
- ▲ 始终等到分选柱储液器排空后再进行下一步操作。

#### 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 3 mL 的缓冲液润洗分选柱：
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，这是单核细胞。
4. 加 3 mL 的缓冲液洗脱，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，这是单核细胞，和第三步流出物混合。
5. （可选）将分选柱从分选器中取出，并将其放在合适的收集管上。加入 5 mL 的缓冲液到分选柱中，迅速用塞子推下，得到就是非目的细胞。