

## 髓鞘分选磁珠，人，小鼠，大鼠(92-01-0306)

### [组分]

4 mL 人、小鼠、大鼠髓鞘分选磁珠：与单克隆抗小鼠髓鞘抗体（小鼠 IgM）结合的磁珠。

[规格] 多达 200 次分离。

[保存形式] 髓鞘分选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] 2 - 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，用髓鞘分选磁珠对单细胞悬浮液中的髓鞘碎片进行磁性标记。然后，将细胞悬浮液装入分选柱，该分选柱置于分选器的磁场中。磁性标记的髓鞘被保留在柱内，未标记的细胞顺着分选柱流出。将柱从磁场中移出后，磁性保留的髓鞘可作为正选部分被洗脱出来，用于进一步的实验或流式细胞分析。

### [背景信息]

髓鞘是一种特殊的膜，可保护和绝缘外周和中枢神经系统中的轴突。在小鼠和大鼠中，髓鞘化始于出生前后的脊髓，并在出生后第一个月在大脑中完成。人类的髓鞘形成始于胎儿期后半期的脊髓，在出生后第一年达到高峰，并可持续到 20 岁。

髓鞘分选磁珠可以从单细胞悬液中富集髓鞘碎片，定量测定髓鞘量，这对脱髓鞘和再髓鞘化研究特别有意义。

## [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）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。

- 分选柱和分选器。
- 神经组织解离试剂盒(P)
- 预分离过滤器去除细胞团块。
- (可选) 荧光偶联的髓鞘抗体用于流式分析。
- (可选) 组织解离器，全自动组织解离器。

## [步骤]

### 一、样本准备

在制备神经组织单细胞悬液时，强烈建议使用神经组织解离试剂盒（P），以确保结果可靠，尤其是在随后的定量分析中。详情请参阅相关说明书。该试剂盒可与组织解离器或全自动组织解离器结合使用。

### 二、磁珠标记

- ▲ 使用自动组织解离器的自动标记功能，细胞可以用磁珠进行标记。
- ▲ 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。
- ▲ 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。

### 小鼠组织

老鼠年龄越大，髓磷脂含量就越多。因此，缓冲液和髓磷脂分选磁珠的体积取决于年龄，并应根据下表进行调整。

小鼠脑	<2周	2-3周	>3周
体重	300 mg	400 mg	500 mg
每只小鼠全脑缓冲液的体积	180 $\mu$ L	1080 $\mu$ L	1800 $\mu$ L
每只小鼠全脑髓磷脂分选磁珠的体积	20 $\mu$ L	120 $\mu$ L	200 $\mu$ L
所需 xL 柱的数量	1 (最多 2 个脑)	2	3
所需自动分选器柱子数量	1 (最多 2 个脑)	1	1

上表指的是 CD1 小鼠。如果使用 Balb/c 或 C57/BL6 小鼠的大脑，重量可能会有所不同，因此应确定。

例如，使用 3 个 P18 小鼠大脑（出生后第 18 天）时，在细胞团中加入 3240  $\mu$ L 缓冲液（ $3 \times 1080$   $\mu$ L）和 360  $\mu$ L 髓鞘分选磁珠（ $3 \times 120$   $\mu$ L）。孵育后，因为需要 6 个 xL 柱，所以最多可加入 6000  $\mu$ L 缓冲液（ $6 \times 1000$   $\mu$ L），并在每个 xL 柱中加入 1000  $\mu$ L 悬浮液。

#### 对于解剖的组织块而非整个小鼠大脑

称量组织块的重量，并计算其相对于整个大脑的重量。将缓冲液和髓鞘分选磁珠的体积除以该系数。

例如，一只 P18 小鼠的小脑重约 100 毫克。因此，将缓冲液和髓鞘分选磁珠的体积除以 4。当仅使用上例中三只 P18 小鼠大脑中的小脑时，请使用 810  $\mu$ L 缓冲液（ $3240$   $\mu$ L:4）和 90  $\mu$ L 髓鞘分选磁珠（ $360$   $\mu$ L:4）。孵育后，注入缓冲液至 2000  $\mu$ L，因为需要 2 个 xL 柱，并在每个 xL 柱中加入 1000  $\mu$ L 悬浮液。

## 大鼠组织

称量大鼠脑组织碎片的重量，并计算它们与整个小鼠脑重量。将缓冲液和髓鞘分选磁珠的体积乘以该系数。例如，一只 P18 大鼠的大脑重约 800 毫克。因此，将缓冲液和髓鞘分选磁珠的体积乘以 2 倍。缓冲液 2160 $\mu$ L ( $2 \times 1080 \mu$ L) 和 240  $\mu$ L 髓鞘分选磁珠 ( $2 \times 120 \mu$ L)。孵育后，填充至 4000  $\mu$ L 缓冲液，由于需要 4 个 xL 柱，并在每个 xL 柱中加入 1000  $\mu$ L 悬浮液。

## 人源组织

称量人脑组织片段的重量，并计算其与整个小鼠大脑的重量。将缓冲液和髓鞘分选磁珠的体积乘以该系数。例如，对于 500 毫克任何年龄的人体组织，使用 1800  $\mu$ L 缓冲液、200  $\mu$ L 髓鞘分选磁珠和 3 个 xL 分选柱。

1. 300 $\times$ g 离心 10 分钟。去除上清。
2. 根据上表添加缓冲液的体积。
3. 按上表添加髓鞘分选磁珠的体积。
4. 混匀，不要涡旋，2-8 $^{\circ}$ C 孵育 15 分钟。
5. (可选) 用于流式细胞分析时，孵育 5 分钟后加入与髓鞘分选磁珠相同体积的标记检测试剂。充分混合。孵育剩余的 10 分钟。
6. 将缓冲液填充到适当的体积，使细胞悬液在一个 xL 上的用量为 1000  $\mu$ L。

▲注:如按表需要 3 个 xL 分选柱，则最多填充 3000  $\mu$ L 的缓冲液，每个 xL 分选柱加入 1000  $\mu$ L 细胞悬液。

7. 细胞分选步骤。

### 三、细胞分选

- ▲ 根据总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。
- ▲ 为了获得最佳性能，在磁性标记之前获得单细胞悬浮液是很重要的。通过 70  $\mu\text{m}$  尼龙网(预分离过滤器)或适当的网格大小取决于目标细胞，以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。

#### 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。
4. 加 1 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 2 次。收集总流出物，这是未标记的细胞。
5. 为了分离磁性标记的髓鞘，将分选柱从分选器中取出，并将柱放置在合适的收集管上。
6. 加 3 mL 的缓冲液到分选柱中，迅速用塞子推下，得到就是磁性标记的髓鞘细胞。