

嗜碱性粒细胞分选试剂盒II，人(92-01-0310)

[组分]

2 mL FcR 阻断剂：人 IgG

2 mL 嗜碱性粒细胞生物素标记抗体混合物：针对 CD3, CD4, CD7, CD14, CD15, CD16, CD36, CD45RA, HLA-DR 和 CD235a (糖蛋白 A) 的生物素标记单克隆抗体混合物。

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

[规格] 可分选 2×10^9 个细胞总量，多达 200 次分离。

[保存形式] 生物素抗体混合物和抗生物素磁珠储存在含有稳定剂和 0.05% 叠氮化钠的溶液中。

[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]

使用嗜碱性粒细胞分离试剂盒 II，通过去除非嗜碱性粒细胞 (负选) 来分离人嗜碱性粒细胞。用生物素结合的单克隆抗体混合物 (作为一级标记试剂) 和与磁珠结合的抗生物素单克隆抗体 (作为二级标记试剂) 对非嗜碱性粒细胞进行间接磁性标记。两个标记步骤之间无需清洗步骤。在分选器的磁场中，磁性标记的非嗜碱性粒细胞被保留在分选柱上，而未标记的嗜碱性粒细胞则流过分选柱。

[背景信息]

嗜碱性粒细胞分离试剂盒 II 是一种间接磁性标记系统，用于从 PBMC 中负选出嗜碱性粒细胞。非嗜碱性粒细胞，即 T 细胞、NK 细胞、B 细胞、单核细胞、树突状细胞、类红细胞、血小板、嗜中性

粒细胞和嗜酸性粒细胞，可使用抗 CD3、CD4、CD7、CD14、CD15、CD16、CD36、CD45RA、HLA-DR 和 CD235a（糖蛋白 A）的生物素结合抗体混合物和抗生物素磁珠进行间接磁性标记。通过去除磁性标记细胞可分离出高纯度的未标记嗜碱性粒细胞。

[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 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。
- 分选柱和分选器： 根据标记的细胞数量和总细胞数选择合适的分选器和分选柱。
- (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

在处理抗凝外周血或白膜层时，应使用密度梯度离心法分离外周血单个核细胞（PBMC）。

▲注:密度梯度分离后除去血小板,将细胞重悬于缓冲液中,在 200×g 下 20°C 离心 10-15 分钟。小心抽吸上清。重复洗涤步骤。

当处理组织或溶血时,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 2×10^7 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 μm 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 30 μL 缓冲液重悬。
4. 每 10^7 个细胞总量添加 10 μL FcR 阻断剂。
5. 每 10^7 个细胞总量添加 10 μL 生物素抗体混合物。
6. 混匀, 2-8 °C 孵育 10 分钟。

7. 每 10^7 个细胞总量添加 30 μL 缓冲液。
8. 每 10^7 个细胞加入 20 μL 抗生物素磁珠。
9. 混匀，2-8°C 孵育 15 分钟。
10. 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。
11. 用 500 μL 缓冲液重悬最多 10^8 个细胞。
12. 进行细胞分选步骤。

三、细胞分选

- ▲ 根据标记的细胞数量和总细胞数选择合适的分选器和分选柱。
- ▲ 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。收集含有未标记细胞的流出物，代表富集的嗜碱性细胞部分。
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的流出物放在一起，这是未标记的细胞。

xM: $3\times 500\ \mu\text{L}$

xL: $3\times 3\ \text{mL}$

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。洗脱下来的这部分为磁性标记的非嗜碱性粒细胞。