

嗜碱性粒细胞分选试剂盒，人（钻石级）(92-01-0311)

[组分]

2 mL 人 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。

2mL 人 CD123 磁珠：与 CD123 单克隆抗体偶联的磁珠（同型：小鼠 IgG2a）。

[规格] 可分选 2×10^9 个细胞总量。

[保存形式] 生物素抗体混合物、抗生物素磁珠和 CD123 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]

钻石级嗜碱性粒细胞分离试剂盒用于从外周血单个核细胞（PBMC）中分离嗜碱性粒细胞。嗜碱性粒细胞的分离分两步进行。首先，用生物素结合抗体混合物和抗生物素磁珠间接磁标记非嗜碱性细胞。随后，将细胞放在分选柱上进行磁分离，在分选器的磁场中，磁性标记的非嗜碱性粒细胞被保留在柱上，而未标记的嗜碱性粒细胞则通过柱子。在第二步中，富集的嗜碱性粒细胞直接被 CD123 磁珠标记。在随后的磁分离过程中，当分选柱从磁场中移除后嗜碱性粒细胞被洗脱下来。分离后的嗜碱性粒细胞纯度预计接近 100%。

[背景信息]

嗜碱性粒细胞，也称为嗜碱性粒细胞，是一种罕见的白细胞群，外周血中的频率低于 1%。最初由 Paul Ehrlich 于 1879 年描述，嗜碱性粒细胞一直被认为是循环肥大细胞。它们表达高亲和力免疫球蛋白 (Ig) E 受体 (FcεRI)。在受体通过抗原-IgE 复合物的结合交联后，嗜碱性粒细胞脱粒，从而释放炎症介质如组胺和白三烯。因此，嗜碱性粒细胞在过敏，哮喘和免疫中起主要作用。

[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。
- (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 $200\times g$ 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、磁珠标记非嗜碱性粒细胞

▲ 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 10^8 个细胞总量。当处理少于 10^8 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 2×10^8 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 10^8 个细胞总量使用 $300\ \mu\text{L}$ 缓冲液重悬。
4. 每 10^8 个细胞总量添加 $100\ \mu\text{L}$ FcR 阻断剂。
5. 每 10^8 个细胞总量添加 $100\ \mu\text{L}$ 生物素抗体混合物。

6. 混匀，2-8 °C 孵育 10 分钟。
 7. 每 10^8 个细胞总量添加 300 μ L 缓冲液。
 8. 每 10^8 个细胞加入 200 μ L 抗生物素磁珠。
 9. 混匀，2-8°C 孵育 15 分钟。
 10. 每 10^8 个细胞加入 10 - 20 mL 缓冲液洗涤细胞，300 \times g 离心 10 分钟，去上清。
 11. 用 500 μ 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。
12. 进行细胞分选步骤。

三、细胞分选：非嗜碱性粒细胞的去除

- ▲ 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。

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，这是嗜碱性粒细胞。
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，这是嗜碱性粒细胞，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。加入缓冲液到分选柱中，迅速用塞子推下，得到就是非嗜碱性粒细胞。

6. 进行富集的嗜碱性粒细胞磁性标记步骤。

四、预富集的嗜碱性粒细胞的磁性标记

▲ 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适用于初始细胞数高达 10^8 个细胞总量。当处理少于 10^8 个初始细胞数时，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 2×10^8 总初始细胞数，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. $300 \times g$ 离心 10 分钟。去除上清。

2. 将细胞重悬于 $100 \mu\text{L}$ CD123 磁珠中。

3. 混匀， $2-8^\circ\text{C}$ 孵育 15 分钟。

4. 每 10^8 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。

5. 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。

6. 进行细胞分选步骤。

五、细胞分选：嗜碱性粒细胞的阳性分选

▲ 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 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 500 μL 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。
4. 加 500 μL 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，和第三步流出物混合。
5. 将分选柱从分选器中取出，并将其放在合适的收集管上。

▲ 注：若要进行第二次分选柱分选，可直接将细胞从第一个分选柱洗脱到第二个分选柱上，代替收集管。

6. 加入 1 mL 缓冲液到分选柱中，迅速用塞子推下，得到就是磁性标记的嗜碱性粒细胞。
7. 为了提高嗜碱性粒细胞的纯度，洗脱的部分可以在第二个 xM 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。