

A2B5分选磁珠试剂盒，人，小鼠(92-01-0303)

[组分]

1 mL 人和小鼠抗 A2B5-APC：与 APC 结合的单克隆抗 A2B5 抗体（克隆：105-HB29；同种型：小鼠 IgM）。

2 mL 抗 APC 磁珠：与单克隆抗 APC 抗体（同种型：小鼠 IgG1）偶联的磁珠。

[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% 叠氮化钠的溶液中。

[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，用抗 A2B5-APC 和抗 APC 磁珠对多能干细胞衍生的 A2B5+ 细胞进行间接磁性标记。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 A2B5+ 细胞被保留在柱内，未标记的细胞顺着分选柱流出。将分选柱从磁场中移出后，磁性保留的 A2B5+ 细胞可作为正选细胞部分被洗脱出来。

[背景信息]

基于 A2B5 抗原的表达，抗 A2B5 磁珠试剂盒被开发用于分离人和小鼠多能干细胞衍生的神经胶质前体细胞。神经节苷脂 GT3 及其 O-乙酰化衍生物是主要的 A2B5 反应性神经节苷脂。在限定条件下人

和小鼠多能干细胞的体外分化揭示少突胶质细胞前体细胞表达表面标志物 A2B5。体外产生的神经胶质前体的磁性富集将有助于获得高纯度的 A2B5 阳性细胞群，甚至可以缩短已建立的分化方案。

[试剂和仪器要求]

- DPBS 缓冲液:不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的 Dulbecco 磷酸盐缓冲盐水(DPBS)。
 - PB 缓冲液:Dulbecco 's 磷酸盐缓冲盐水(DPBS)，不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 和 0.5%牛血清白蛋白(BSA)。
- 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。
- 分选柱和分选器：为了获得最佳纯度和回收率，强烈建议使用 xL 柱。
 - (可选) 类胚胎体解离试剂盒，小鼠和人
 - (可选) 胰蛋白酶溶液:0.05%胰蛋白酶，2mMEDTA。
 - (可选) 预分离过滤器去除细胞团块。
 - (可选) 5mL 血清移液管。
 - (可选) 试管混匀器

[步骤]

一、样本准备

使用抗 A2B5 磁珠试剂盒，下面提到的分化方案被用于优化多能干细胞衍生的胶质前体的富集。

制备小鼠细胞

多能干细胞在 DMEM 和 10% 胎牛血清中以 1×10^5 细胞/毫升的悬浮液培养 4-5 天分化为胚状体。

在抗体标记前，使用类胚体解离试剂盒生成单细胞悬浮液。

人源细胞的制备

人类多能干细胞的分化遵循 Chambers 等人 和 Zhou 等人发表的方案。简言之，将 2×10^6 多能干细胞培养在涂有基质胶的 10 厘米培养皿中，培养基为 DMEM/F12，补充 20% 的血清替代物、dorsomorphin (1 μ M) 和 thiazovivin (2 μ M)。

分化 10 天后，按以下方法收获细胞：

1. 移除分化培养基，用 DPBS 缓冲液清洗培养板两次。
2. 每 10 厘米培养皿加入 2 毫升胰蛋白酶溶液 (0.05% 胰蛋白酶，2 mM EDTA)，37 $^{\circ}$ C，5 分钟，使细胞分离。
3. 加入大豆胰蛋白酶抑制剂停止酶促反应。
4. 用 5 mL 血清移液管上下吹吸，使其离解为单细胞悬浮液。
5. 将细胞通过 70 μ m 尼龙网，以去除可能堵塞分选柱的细胞团块。使用前用缓冲液或培养基湿润过滤器。

▲ 注：由于 A2B5 表位对胰蛋白酶敏感，长时间胰蛋白酶处理细胞可能会降低 A2B5 抗体的标记效率。

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 70 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 \times g 离心 5 分钟。去除上清。

3. 每 10^7 个细胞总量使用 100 μL PB 缓冲液重悬。

4. 每 10^7 个细胞总量添加 10 μL 抗 A2B5-APC。

5. 混匀，2-8 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 10 分钟。

▲注:(可选)混匀器可用于连续混合更大的体积。以大约 4 转/分的速度运行。

6. 每 10^7 个细胞加入 1-2 mL PB 缓冲液洗涤细胞，300 \times g 离心 5 分钟，去上清。

7. 每 10^7 个细胞总量使用 80 μL PB 缓冲液重悬。

8. 每 10^7 个细胞总量使用 20 μL Anti-APC 磁珠。

9. 混匀，2-8 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 15 分钟。

▲注:(可选)混匀器可用于连续混合更大的体积。以大约 4 转/分的速度运行。

10. 每 10^7 个细胞加入 1-2 mL PB 缓冲液洗涤细胞，300 \times g 离心 5 分钟，去上清。

11. 用 500 μL PB 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。

12. 进行细胞分选步骤。

三、细胞分选

▲ 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。

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。
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，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。
6. 加入 5 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细胞。