

视网膜神经节细胞分选试剂盒，大鼠(92-01-0307)

[组分]

0.3 mL 生物素化去除抗体：生物素偶联的单克隆抗体。

2.5 mL 抗生物素磁珠

1.25 mL CD90.1 磁珠，小鼠和大鼠：与单克隆小鼠抗小鼠/大鼠 CD90.1 抗体（同种型：小鼠 IgG2a）偶联的磁珠。

[规格] 25 次分选。当每个样品使用 10 个视网膜(5 只大鼠，年龄 P6-7)时，指定的分选次数有效。

[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 °C 避光保存，请勿冷冻。有效期见试剂外标签。

[分选原理]

用 CD90.1 磁珠对视网膜神经节细胞进行磁性标记。内皮细胞和小胶质细胞也表达 CD90.1，它们同时被生物素去除抗体和抗生物素磁珠标记。使用 MACSiMACG Separator 对标记了磁珠的内皮细胞和小胶质细胞进行去除。视网膜神经节细胞预先富集在上清液中。将预富集的细胞悬浮液装入 xM 柱，该分选柱置于分选器的磁场中。磁性标记的 CD90.1+ 视网膜神经节细胞被保留在分选柱中，未标记的细胞顺着分选柱流出。将分选柱从磁场中移出后，磁性标记的 CD90.1+ 细胞作为正选部分被洗脱，正选细胞部分在第二个分选柱上分离。

[背景信息]

大鼠视网膜神经节细胞分选试剂盒是为从大鼠视网膜中分离视网膜神经节细胞（RGC）而开发的。视网膜神经节细胞是中枢神经系统的神经元，将信息从眼睛投射到大脑的视觉中枢。在青光眼等眼科疾病中，RGC 的退化会导致失明。RGCs 是最早被分离并在确定条件下培养的神经元之一。它们被用于研究神经元与神经胶质细胞的相互作用。在临床前研究中，RGCs 可用于开发神经再生疗法。分选这些神经元的最佳时期是出生后第 6-7 天。使用磁性细胞分选出的 RGCs 存活率高、形态正常。

[试剂和仪器要求]

- DPBS/BSA 缓冲液: Dulbecco 的磷酸盐缓冲盐水(DPBS)含有 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} ，并含有 0.5%牛血清白蛋白(BSA)，例如 100 mL DPBS 和 0.5 g BSA。缓冲液在 2-8°C 下保存 5 天。使用前将其恢复至室温。
- xM 分选柱
- 5 毫升聚苯乙烯圆底管
- 15 毫升聚苯乙烯圆底管
- 神经组织解离试剂盒
- 试管混匀仪
- MACSiMAG Separator
- (可选) 荧光偶联的 CD90.1 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。

[步骤]

一、样本准备

▲使用神经组织解离试剂盒 - 出生后神经元制备大鼠视网膜组织的单细胞悬液。详细方案请参阅神经组织解离试剂盒 - 出生后神经元的说明书。

视网膜神经节细胞分离试剂盒是为与神经组织解离试剂盒（神经组织解离试剂盒 - 出生后神经元）结合使用而开发的，可确保磁性标记的表位完整性。其他解离方案的使用尚未经过测试。

二、磁珠标记

▲ 除非另有说明，所有步骤必须在室温下进行。

▲ 下面给出的磁性标记体积是 10 个视网膜细胞（5 只大鼠，年龄 P6-7），最终体积为 500 μL 。

不建议使用较少数量的大鼠。当处理更多大鼠的视网膜时，应相应增加所有试剂的体积和总体积，例如，处理 10 只大鼠的 20 个视网膜时，所有试剂的体积和总体积应为原来的两倍。

1. 将 10 个视网膜细胞（5 只大鼠）重悬于 440 μL 的 DPBS/BSA 缓冲液中。

2. 加入 50 μL CD90.1 磁珠 和 10 μL 生物素化去除抗体。

3. 轻轻混合并在室温下孵育 15 分钟，每 5 分钟轻轻混合一次。

（可选）对于流式细胞仪分析，在孵育 5 分钟后加入染色抗体，如 25 μL CD90.1-FITC 和 3.1 μL CD48-PE。轻轻混合并继续孵育剩余的 10 分钟。

4. 加入 5 mL DPBS/BSA 缓冲液清洗细胞，然后 130 \times g 离心 5 分钟。小心吸出上清液。

5. 用 1 mL 移液器吸头轻轻吹吸 15 次，重悬于 400 μL DPBS/BSA 缓冲液中。不要涡旋细胞。

6. 使用前彻底重悬抗生物素磁珠，以获得溶液中磁珠的均匀分散，例如，涡旋 30 秒。然后立即移取 100 μL 至 5 mL 试管中。

7. 立即加入 400 μL 单细胞悬浮液，并与抗生物素磁珠轻轻混合。

8. 使用混匀仪（持续运行，中速/8 rpm）在室温下孵育 15 分钟。

▲ 注：混匀仪的大支架可根据 5 mL 试管的大小进行调整。

9. 进行磁性分选：消耗内皮细胞和小胶质细胞。

三、细胞分选：内皮细胞和小胶质细胞的去除

▲ 选择 MACSiMAG Separator。

▲ 移液上清时不要接触黏附的细胞。

1. 从混匀仪中取出 5 mL 离心管并打开。用 300 μL DPBS/BSA 冲洗管盖，并将其加入管中的 500 μL 中。

2. 将 5 mL 试管放入 MACSiMAG Separator 的磁场中。

▲ 注：使用试管架可插入 1.5 mL 至 5 mL 大小的试管。详见 MACSiMAG Separator 说明书。

3. 让磁珠标记的细胞附着在管壁上 3 分钟。

4. 将试管保留在 MACSiMAG Separator 中，小心地将上清液移入放置在磁铁外的新的 5 mL 试管中。

上清液是含有视网膜神经节细胞的预富集部分。

▲ 注：在此步骤中，上清液不需要完全移除；剩余的靶细胞将在下一步中收集。

5. 在 MACSiMAG Separator 中用 0.5 mL DPBS/BSA 冲洗管壁，清洗粘附的细胞。

6. 让细胞粘附在管壁上 1 分钟。

7. 将试管保留在 MACSiMAG Separator 中，小心地将上清液移入装有步骤 4 中预富集部分的试管中。

8. 将装有步骤 7 预富集馏分的 5 mL 试管放入 MACSiMAG 分离器。让剩余的磁珠标记细胞附着在管壁上 3 分钟。
9. 将试管保留在 MACSiMAG 分离器中，小心地将上清液（预富集部分）移入 15 mL 试管中。
10. 室温下 $130\times g$ 离心 2 分钟。小心吸出上清液。
11. 用 1 mL 移液管吸头轻轻吹吸 15 次，将细胞重悬于 500 μ L DPBS/BSA 缓冲液中。不要涡旋细胞。
12. 进行磁性分离：阳性选择 CD90.1+ 视网膜神经节细胞。

四、细胞分选：CD90.1+ 视网膜神经节细胞的阳性分选

▲ 选择合适的分选器。

▲ 最多可将来自 40 个视网膜或 20 只大鼠（P6-7 岁）的细胞应用到 xM 柱中。

▲ 连续使用 2 个 xM 分选柱分离样品。

▲ 一旦分选柱储液器空了，立即加入等量的缓冲液进行清洗步骤。

1. 将 2 个 xM 分选柱放入合适的分选器的磁场中。详情请参阅 xM 分选柱说明书。
2. 用 500 μ L DPBS/BSA 缓冲液冲洗分选柱。
3. 将细胞悬浮液加到第一个 xM 柱上。收集含有未标记细胞的流出液，以备分析之用。
4. 用 3×500 μ L 的 DPBS/BSA 缓冲液洗柱。收集通过的未标记细胞，并与步骤 3 的流过液合并，以备分析之用。
5. 从分选器中取出第一根分选柱，将其放在第二根置于分选器中的 xM 分选柱上。用移液管吸取 1 mL DPBS/BSA 缓冲液到第一个 xM 柱上，然后将活塞推入柱中，立即冲出磁性标记的细胞。

6. 让细胞通过第二个 xM 柱，然后用 $3 \times 500 \mu\text{L}$ 的 DPBS/BSA 缓冲液清洗。
7. 从分选器中取出第二个 xM 柱，将其放入合适的收集管中。
8. 用 1 mL DPBS/BSA 缓冲液移到分选柱上。用力将活塞推入分选柱，立即冲出磁性标记的细胞。
9. 测定细胞数。在 37°C 下以适当的密度在涂有聚赖氨酸的培养皿中培养细胞，或立即进行后续应用。

▲注：细胞培养中可能会观察到未结合的磁珠颗粒，但不会伤害细胞。