

谱系细胞去除试剂盒，小鼠(92-01-0057)

[组分]

1 mL **生物素抗体混合物**：生物素偶联的单克隆抗体 CD5、CD45R (B220)、CD11b、抗 Gr-1 (Ly-6G/C)、7-4 和 Ter-119 组成的混合物。

2 mL **抗生物素磁珠**：与单克隆抗生物素抗体（克隆：Bio3-18E7.2；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] 生物素抗体混合和抗生物素磁珠均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，请勿冻存。有效期见试剂外标签。

[分选原理]

使用谱系细胞去除试剂盒，通过去除表达一组所谓“谱系”抗原（阴性选择）的细胞来分离谱系阴性细胞。谱系阳性细胞使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）进行间接磁性标记。两个标记步骤之间无需清洗。在分选器的磁场中，磁性标记的谱系细胞被保留在分选柱上，而未标记的谱系阴性细胞则通过分选柱排出。

[背景信息]

谱系细胞去除试剂盒是一种磁性标记系统，用于去除骨髓中的成熟造血细胞，如 T 细胞、B 细胞、单核细胞/巨噬细胞、粒细胞和红细胞及其固有前体细胞。为了进行细胞去除，细胞会被磁性标记，

标记物是针对一系列所谓的 "谱系 " 抗原 (CD5、CD45R (B220)、CD11b、抗 Gr-1 (Ly- 6G/C)、7-4 和 Ter-119 抗体) 的生物素化抗体混合物和抗生物素磁珠。

这种标记程序不会触及谱系阴性细胞, 因此可以根据 CD117 或 Sca-1 等标记物的表达情况进一步分离谱系细胞。

[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。
 - ▲ 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) 预分离过滤器去除细胞团块。

[步骤]

一、样本准备

当处理组织时, 用标准制备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。

制备骨髓细胞

▲ 所有步骤都应在冰上进行。

1. 使用注射器和 26G 针头，用缓冲液冲洗股骨（和胫骨），收集小鼠骨髓细胞。
2. 用吸管轻柔地将细胞分散数次。
3. 将细胞通过 30 μm 尼龙网，以去除可能堵塞分选柱的细胞团块。使用前用缓冲液浸湿过滤器。
4. 加入缓冲液清洗细胞，在 2-8 $^{\circ}\text{C}$ 下以 300 \times g 离心 10 分钟。用吸管完全吸去上清液。
5. 用缓冲液重悬细胞团，取部分的细胞进行细胞计数。

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 \times g 离心 10 分钟。去除上清。

3. 每 10^7 个细胞总量使用 40 μL 缓冲液重悬。
 4. 每 10^7 个总细胞加入 10 μL 生物素抗体混合物。
 5. 混合均匀，在 2 - 8 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 10 分钟。
 6. 每 10^7 个细胞加入 30 μL 缓冲液。
 7. 每 10^7 个细胞总量添加 20 μL 抗生物素磁珠。
 8. 混匀，2-8 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 分钟。
 9. 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。
 10. 用 500 μL 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。
11. 进行细胞分选步骤。

三、细胞分选

- ▲ 根据总细胞数和标记细胞数选择合适的分选柱和分选器。
- ▲ 注:使用正常小鼠骨髓时，标记的细胞数几乎等于总细胞数。注意不要超过所标记细胞的柱容量。

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。收集包含未标记细胞的流出液。

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，和第三步流出物混合，这是谱系阴性细胞。

xM: 3×500 μ L

xL: 3×3 mL

5. (可选) 洗脱磁性保留的细胞。这部分代表磁性标记谱系阳性细胞。