

谱系细胞去除试剂盒，人(92-01-0291)

[组分]

1 mL 生物素抗体混合物：单克隆抗体 CD2、CD3、CD11b、CD14、CD15、CD16、CD19、CD56、CD123 和 CD235a(糖蛋白 A) 偶联生物素组成的混合物。

2 mL 抗生物素磁珠：与单克隆抗生物素抗体（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] 生物素抗体混合物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，请勿冷冻。有效期见试剂外标签。

[分选原理]

使用谱系细胞去除试剂盒，通过去除表达所谓“谱系”抗原的细胞，分选出谱系阴性细胞（未接触的分选）。

谱系阳性细胞以生物素结合的单克隆抗体混合物作为一级标记试剂，以抗生物素单克隆抗体结合的磁珠作为二级标记试剂，进行间接磁性标记。磁性标记的谱系细胞在分选器的磁场中保留在分选柱上，而未标记的谱系阴性细胞则通过分选柱流出。

[背景信息]

谱系细胞去除试剂盒是一种间接磁珠标记系统，用于从骨髓、脐血、动员后白细胞单采术样本中去除成熟的造血细胞，如 T 细胞，B 细胞，NK 细胞，树突状细胞，单核细胞，粒细胞，红细胞，以及前体细胞。通过去除谱系细胞可富集未经标记的干/祖细胞。

生物素交联的抗体混合物标记 CD2, CD3, CD11b, CD14, CD15, CD16, CD19, CD56, CD123 和 CD235a (血型糖蛋白 A) 细胞。随后用抗生物素磁珠对这些细胞进行标记。通过去除磁性标记的细胞获得谱系阴性的干/祖细胞。

[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。
- (可选) HSC-CFU 培养基用于评估去谱系细胞部分的造血移植潜力。
- (可选) NH CFU-F 培养基用于评估和定量去谱系细胞部分中的非造血干细胞。

[步骤]

一、样本准备

在处理抗凝骨髓或脐带血时，应通过密度梯度离心分离单核细胞。

▲注:在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。

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 $30\ \mu\text{m}$ 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 10^7 个细胞总量使用 $40\ \mu\text{L}$ 缓冲液重悬。
4. 每 10^7 个总细胞加入 $10\ \mu\text{L}$ 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 500-1000 μL 缓冲液，用缓冲液仔细清洗细胞，在 $300\times g$ 离心 10 分钟。用移液管完全吸掉上清。
 7. 每 10^7 个细胞加入 80 μL 缓冲液。
 8. 每 10^7 个细胞总量添加 20 μL 抗生物素磁珠。
 9. 混匀，2-8 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 分钟。
 10. 每 10^7 个细胞加入 500 - 1000 μL 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。
- ▲ 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

- ▲ 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：在处理骨髓细胞时，标记细胞的数量几乎等于细胞总数。注意不要超过标记细胞柱的容量。

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。
4. 让细胞通过并收集流出液，因为未标记细胞的部分代表富集的谱系阴性细胞。

5. 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 4 步流出物混合，这是谱系阴性细胞。

xM: 3×500 μL

xL: 3×3 mL

6. (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。