

## CD138+浆细胞分选试剂盒，小鼠(92-01-0082)

### [组分]

2 mL 小鼠非浆细胞去除混合物：生物素结合的单克隆抗小鼠抗体混合物，其针对：CD49b (DX5；

同型：大鼠 IgM) ， CD45R (B220；同型：大鼠 IgG2a)

2 mL 抗生物素磁珠：与抗生物素单克隆抗体（同型：小鼠 IgG1）偶联的磁珠

2 mL 小鼠 CD138 磁珠：与小鼠 CD138 单克隆（同型：大鼠 IgG2a）抗体偶联的磁珠

[规格] 可分选  $2 \times 10^9$  个细胞总量。

[保存形式] 非浆细胞去除混合物、抗生物素磁珠以及 CD138 磁珠储存在含有稳定剂和 0.05% 叠氮化钠的缓冲液中。

[储存条件] 4 - 8 °C 避光保存，请勿冻存。有效期见试剂外标签。

### [分选原理]

小鼠浆细胞的分选分两步进行。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浆细胞。

然后通过分选柱分离去除标记细胞。

第二步，用 CD138 磁珠直接标记浆细胞，并通过阳性分选从预富集的细胞组分中分离出来。

磁性标记的浆细胞保留在分选柱上，并在分选柱脱离磁场后被洗脱。

为了获得最高的纯度，含有浆细胞的正选细胞部分将在第二个分选柱上分离。

## [背景信息]

小鼠 CD138<sup>+</sup> 浆细胞分选试剂盒是为分离分泌 CD138<sup>+</sup> CD45R (B220)<sup>low/-</sup> CD19<sup>low/-</sup> 抗体的浆细胞而开发的。CD138 (Syndecan-1) 是富含硫酸乙酰肝素的整合膜蛋白多糖，其作为间质胶原，纤连蛋白和血小板反应蛋白的基质受体起作用。CD138 主要在成熟小鼠组织的上皮细胞表面表达，其在 B 谱系细胞上的表达与其发育阶段，位置和粘附相关。在小鼠中，CD138 在骨髓中的 B 前体细胞和未成熟 B 淋巴细胞上表达，当 B 细胞迁移到外周时，它就会丢失，在循环和外周 B 细胞中不存在，并且在 B 细胞分化为浆母细胞和浆细胞时重新表达。该试剂盒适用于从脾脏、淋巴结和骨髓中分离高纯度的 CD138<sup>+</sup> 浆细胞。

## [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。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, 例如明胶、小鼠血清或胎牛血清。不建议使用含有 Ca<sup>2+</sup> 或 Mg<sup>2+</sup> 的缓冲液或培养基。
- 分选柱和分离器。
- (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。

## [步骤]

### 一、样本准备

用标准方法从淋巴组织中制备单细胞悬液。

▲注：样品制备过程中应避免使用胶原酶消化，因为消化步骤可能会导致细胞抗体标记效果减弱。

### 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  $10^8$  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  $2 \times 10^8$  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。

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  $400 \mu\text{L}$  缓冲液重悬。

4. 每  $10^8$  个细胞总量添加  $100 \mu\text{L}$  非浆细胞去除混合物。

5. 混匀， $4-8 \text{ } ^\circ\text{C}$  孵育 10 分钟。

▲ 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。

6. 加入 5-10 倍标记体积的缓冲液洗涤细胞， $300 \times g$  离心 10 分钟，去上清。

7. 每  $10^8$  个细胞总量使用  $900 \mu\text{L}$  缓冲液重悬。

8. 每  $10^8$  个细胞总量添加 100  $\mu\text{L}$  抗生物素磁珠。

9. 混匀，4  $^{\circ}\text{C}$  孵育 15 分钟。

▲ 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。

10. 加入 5 -10 倍标记体积的缓冲液洗涤细胞，300 $\times$ g 离心 10 分钟，去上清。

11. 用缓冲液重悬细胞。

LD 分选柱去除：500  $\mu\text{L}$  缓冲液重悬最多  $1.25 \times 10^8$  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：非浆细胞的去除

#### 使用 LD 分选柱进行去除

1. 将 LD 分选柱放入合适的分选器的磁场中。

2. 用 2 mL 缓冲液冲洗分选柱。

3. 将细胞悬浮液装载到分选柱上。

4. 收集通过的未标记细胞，用  $2 \times 1\text{mL}$  缓冲液清洗分选柱。柱排空后，依次加入缓冲液进行清洗。

收集总流出液。其中包含未标记的预富集浆细胞部分。

5. 继续分选浆细胞。

### 四、浆细胞的磁珠标记

▲下面给出的磁珠标记体积用于初始起始细胞数高达  $10^8$  个白细胞。对于较大的初始细胞数，请相应地扩大容量。

1.  $300\times g$  离心 10 分钟。去除上清。
2. 每  $10^8$  个细胞总量使用 400  $\mu\text{L}$  缓冲液重悬。
3. 每  $10^8$  个细胞总量添加 100  $\mu\text{L}$  LCD138 磁珠。
4. 混匀，4–8  $^{\circ}\text{C}$  孵育 15 分钟。

▲ 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。

5. (可选) 添加染色抗体，4–8  $^{\circ}\text{C}$  避光孵育 5 分钟。
6. 加入 5-10 倍标记体积的缓冲液洗涤细胞， $300\times g$  离心 10 分钟，去上清。
7. 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。

8. 进行细胞分选步骤。

## 五、细胞分选：浆细胞的阳性分选

### xM 分选柱进行阳性分选

1. 将分选柱置于相对应的分选器中。
2. 用 500  $\mu\text{L}$  的缓冲液润洗分选柱。
3. 将细胞悬液转移至分选柱中。
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。收集流出的未标记的细胞。加 500  $\mu\text{L}$  的缓冲液，待液体全部流尽，再加入缓冲液，一共洗 3 次，收集总流出物。

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，可将细胞直接从第一个分选柱洗脱到第二个分选柱上，代替使用收集管。

6. 加 1mL 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。

7. 使用新的分选柱，重复步骤 1 至 6 所述的磁分选程序。