

MDSC骨髓抑制细胞分选试剂盒，小鼠(92-01-0110)

[组分]

2mL 小鼠抗-Ly-6G-生物素 (MDSC 试剂盒)：生物素标记的 Ly-6G 单克隆抗体 (同型：大鼠 IgG2a)

2mL 小鼠抗-Gr-1-生物素 (MDSC 试剂盒)：生物素标记的 Gr-1 单克隆抗体 (同型：大鼠 IgG2b)

2x2mL 抗生物素磁珠：偶联生物素单克隆抗体 (同型：小鼠 IgG1) 的磁珠

2mL 链霉亲和素磁珠 (MDSC 试剂盒)：偶联链霉亲和素的磁珠

1mL 小鼠 FcR 阻断试剂

[规格] 可分选 2×10^9 个细胞总量，多达 20 次分离。

[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，请勿冻存。有效期见试剂外标签。

[分选原理]

骨髓抑制细胞分选试剂盒是为分选 $Gr-1^{high} Ly-6G^{+}$ 和/或 $Gr-1^{dim} Ly-6G^{-}$ 髓系细胞而开发的。首先，用抗 Ly-6G-生物素 (MDSC 试剂盒) 和抗生物素磁珠对 $Gr-1^{high} Ly-6G^{+}$ 细胞进行间接磁性标记。然后，将细胞悬浮液装入分选柱，给分选柱置于分选器的磁场中。磁性标记的 $Ly-6G^{+}$ 细胞被保留在柱内。未标记的细胞流过分选柱， $Gr-1^{dim} Ly-6G^{-}$ 髓系细胞被预富集。从磁场中移除分选柱后，磁性保留的 $Gr-1^{high} Ly-6G^{+}$ 细胞可作为正选细胞部分被洗脱出来。为了提高纯度，含有 $Gr-1^{high} Ly-6G^{+}$ 髓系细胞的正选细胞部分会在第二个分选柱上分离。用抗-Gr-1-生物素 (MDSC 试剂盒) 和链霉亲和素磁珠 (MDSC 试剂盒) 间接磁性标记第一个流过分选柱中的 $Gr-1^{dim} Ly-6G^{-}$ 髓系细胞，并通过正选从

预富集的 Gr-1^{dim}Ly-6G⁻髓系细胞部分中分选出来。磁性标记的 Gr-1^{dim}Ly-6G⁻髓系细胞被保留在分选柱上，从磁场中移除分选柱后再进行洗脱。为了提高纯度，含有 Gr-1^{dim}Ly-6G⁻髓系细胞的正选细胞部分在第二个分选柱上分离。

[背景信息]

骨髓抑制细胞 (MDSCs) 是未成熟骨髓细胞的异质群体，表征为 CD11b⁺Gr-1⁺，具有诱导 T 细胞功能障碍的能力。它们出现在各种病理状态 (癌症，感染，自身免疫疾病) 中，其中未成熟骨髓祖细胞分化成粒细胞，巨噬细胞或树突细胞被部分阻断。MDSCs 的活化会导致免疫抑制因子精氨酸酶 1 和 iNOS、活性氧 (ROS) 和一氧化氮 (NO) 的产生增加，从而影响 T 细胞的增殖能力、诱导 T 细胞凋亡或导致 T 细胞无反应。

使用骨髓抑制细胞分选试剂盒分选出的 MDSCs 抑制 T 细胞功能的能力是通过在 BALB/c 和 C57BL/6 小鼠中分别使用 CT26、4T1、MCA203 和 EL-4 肿瘤模型来测定的。

骨髓抑制细胞分选试剂盒是为分离多核 Gr-1^{high}Ly-6G⁺ 和单核 Gr-1^{dim}Ly-6G⁻ 髓系细胞而开发的。根据标记物 Ly-6C 的表达，Gr-1^{dim}Ly-6G⁻ 细胞可进一步细分为 Gr-1^{dim}Ly-6C^{high}Ly-6G⁻ 细胞和 Gr-1^{dim}Ly-6C^{low}Ly-6G⁻ 细胞。Ly-6C^{high} 亚群和 Ly-6C^{low} 亚群之间的比例取决于所使用的肿瘤模型。

[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,例如小鼠血清白蛋白、小鼠血清或胎牛血清。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: 使用两个 xL 柱可对 $\text{Gr-1}^{\text{high}}\text{Ly-6G}^+$ 细胞进行阳性分选。使用一个 xL 分选柱首先去除 Ly-6G^+ 细胞, 然后使用两个 xM 分选柱对 Gr-1^+ 细胞进行阳性分选, 从而富集 $\text{Gr-1}^{\text{dim}}\text{Ly-6G}^-$ 细胞。

- (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。
- (可选) 预分离过滤器去除细胞团块。

[步骤]

一、样本准备

用标准制备方法制备脾脏和肿瘤的单细胞悬液。

▲ 骨髓抑制细胞分选试剂盒 (小鼠) 不适合从骨髓中分离 MDSCs。

▲ 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。

二、磁珠标记 $\text{Gr-1}^{\text{high}}\text{Ly-6G}^+$ 细胞

▲ 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 2×10^8 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。

▲ 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. 4°C ， $300 \times g$ 离心 10 分钟。去除上清。

3. 每 10^8 个细胞总量使用 $350 \mu\text{L}$ 缓冲液重悬。

4. 每 10^8 个细胞加入 $50 \mu\text{L}$ FcR 阻断试剂。

5. 混匀， $2-8^\circ\text{C}$ 孵育 10 分钟。

6. 加入 $100 \mu\text{L}$ 抗 Ly-6G 生物素 (MDSC 试剂盒)。

7. 混匀， $2-8^\circ\text{C}$ 孵育 10 分钟。

8. 每 10^8 个细胞加入 $5-10 \text{ mL}$ 缓冲液洗涤细胞， 4°C $300 \times g$ 离心 10 分钟，去上清。

9. 用 $800 \mu\text{L}$ 缓冲液重悬最多 10^8 个细胞。

10. 添加 $200 \mu\text{L}$ 抗生物素磁珠。

11. 混匀， $2-8^\circ\text{C}$ 孵育 15 分钟。

12. 每 10^8 个细胞加入 $10-20 \text{ mL}$ 缓冲液洗涤细胞， 4°C $300 \times g$ 离心 10 分钟，去上清。

13. 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。

14. 进行细胞分选步骤。

三、细胞分选：阳性分选 Gr-1^{high} Ly-6G⁺ 细胞

▲ 根据总细胞数和 Gr-1^{high} Ly-6G⁺细胞数选择合适的分选柱和分选器。

▲ 一定要等到分选柱储液器排空之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，这是未标记预富集的 Gr-1^{dim} Ly-6G⁻细胞部分。
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。
7. 为提高 Gr-1^{high} Ly-6G⁺ 细胞的纯度，洗脱的部分应在第二个 xL 柱上富集。使用新的分选柱，重复步骤 1 至 6 所述的磁分离程序。
8. 继续进一步分离 Gr-1^{dim} Ly-6G⁻ 细胞。

四、磁珠标记 Gr-1^{dim} Ly-6G⁻细胞

▲ 下面给出的磁性标记体积适用于初始细胞数最多为 10^8 个的细胞。当处理的细胞数少于 10^8 个时，请使用所示的相同试剂体积。当处理的细胞数较多时，应相应增加所有试剂体积和总体积（例如，细胞总数为 2×10^8 时，所有标示的试剂体积和总体积应为原来的两倍）。

1. 在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下以 $300 \times g$ 离心细胞悬浮液 10 分钟。完全去除上清液。
2. 每 10^8 个细胞用 $400\ \mu\text{L}$ 缓冲液重悬细胞颗粒。
3. 每 10^8 个细胞加入 $100\ \mu\text{L}$ 抗-Gr-1-生物素（MDSC 试剂盒）。
4. 混匀并在冰箱（ $2\text{-}8\text{ }^{\circ}\text{C}$ ）中孵育 10 分钟。
5. 每 10^8 个细胞加入 5-10 mL 缓冲液清洗细胞，然后在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下以 $300 \times g$ 离心 10 分钟。完全去除上清液。
6. 每 10^8 个细胞用 $900\ \mu\text{L}$ 缓冲液重悬细胞颗粒。
7. 加入 $100\ \mu\text{L}$ 链霉亲和素磁珠（MDSC 试剂盒）。
8. 混匀并在冰箱（ $2\text{-}8\text{ }^{\circ}\text{C}$ ）中孵育 15 分钟。
9. 每 10^8 个细胞加入 10-20 mL 缓冲液清洗细胞，然后在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下以 $300 \times g$ 离心 10 分钟。完全去除上清液。
10. 用 $500\ \mu\text{L}$ 缓冲液重悬 10^8 个细胞。

▲ 注：细胞数越多，缓冲液容量应相应增大。

11. 进行细胞分选。

五、细胞分选：阳性分选 $\text{Gr-1}^{\text{dim}}\text{Ly-6G}^{\text{+}}$ 细胞

▲ 要达到最高纯度，请连续运行两次分选柱。

1. 将 xM 分选柱置于合适的分选器上。
 2. 用 500 μL 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 $3 \times 500 \mu\text{L}$ 缓冲液冲洗分选柱。收集总流出液；这是未标记的细胞部分。
 5. 从分选器中取出分选柱，将其置于合适的收集管中。
- ▲ 注：若要进行第二次分选柱分选，可将细胞直接从第一根分选柱洗脱到第二根分选柱上，而不用收集管。
6. 向分选柱中加入 1 mL 缓冲液。将活塞推入分选柱，立即冲洗出磁性标记的细胞 ($\text{Gr-1}^{\text{dim}} \text{Ly-6G}^-$)。
 7. 为提高 $\text{Gr-1}^{\text{dim}} \text{Ly-6G}^-$ 细胞的纯度，可将洗脱的部分用第二个 xM 柱富集。使用新的分选柱，重复步骤 1 至 6 所述的磁性分离步骤。