

记忆B细胞分选试剂盒，小鼠(92-01-0122)

[组分]

2 mL 小鼠记忆 B 细胞生物素抗体混合物：生物素偶联的单克隆抗小鼠抗体混合物。

2×2 mL 抗生物素磁珠：与抗生物素单克隆抗体偶联的磁珠

0.2 mL 小鼠抗 IgG1-APC：与 APC 偶联的单克隆抗 IgG1 抗体(同种型:大鼠 IgG1)。

0.2 mL 小鼠抗 IgG2ab-APC：与 APC 偶联的单克隆抗 IgG2ab 抗体(同种型:大鼠 IgG1)

2 mL 抗 APC 磁珠：磁珠偶联单克隆抗 APC 抗体

[规格]，可分选 2×10^9 个细胞总量，多达 20 次分选。

[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。

[原理]

IgG1+/IgG2ab+ 记忆 B 细胞的分离分两步进行。

首先，用生物素结合抗体混合物间接磁性标记非记忆 B 细胞，作为主要标记试剂，然后用抗生物素磁珠去除。在使用混合抗体的第一个孵育步骤中，细胞会额外被抗 IgG1-APC 和抗 IgG2ab-APC 抗体标记。

在第二步中，用抗 APC 磁珠标记预富集的记忆 B 细胞，并在分选柱上进行阳性分选，然后将分选柱置于分选器的磁场中。

将柱从磁场中移出后，磁性保留的 IgG1+/IgG2ab+ 记忆 B 细胞可作为正选细胞部分被洗脱出来。为提高纯度，含有 IgG1+/IgG2ab+ 记忆 B 细胞的正选细胞部分可在第二个柱上分离。

▲注意：在进行磁性分离前，请勿使用 APC 偶联物进行染色，因为它们可能会被抗 APC 磁珠识别。

[背景]

记忆 B 细胞分离试剂盒是为从小鼠脾脏或淋巴结中分离 IgG1+/IgG2ab+ 记忆 B 细胞而开发的。记忆 B 细胞是源自抗原经历的前体增殖的静止 B 细胞。它们能够快速对抗原再次攻击作出反应，从而提供体液免疫保护。

[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。
- (可选)FcR 阻断试剂,小鼠,以避免 Fc 受体介导的抗体标记。
- (可选)荧光标记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。
- 分选柱和分离器。

- (可选) 预分离过滤器去除细胞团块。

[步骤]

一、样本准备

当处理淋巴器官、非淋巴组织或外周血时，使用手工方法或组织解离器制备单细胞悬液。

▲ 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、磁珠标记非记忆 B 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. $300 \times g$ 离心 10 分钟。去除上清。
3. 每 10^8 个细胞总量使用 $380 \mu\text{L}$ 缓冲液重悬。

4. 每 10^8 个细胞总量添加 100 μL 记忆 B 细胞生物素抗体混合物，10 μL Anti-IgG1-APC 和 10 μL Anti-IgG2ab-APC。

▲ 注:仅添加其中一种 APC 偶联抗体，而用 50 μL 缓冲液替代另一种抗体，将导致仅分离出记忆 B 细胞的一个亚群(IgG1+或 IgG2ab+)。

5. 混匀，2-8 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 5 分钟。

6. 每 10^8 总细胞加入 300 μL 缓冲液和 200 μL 抗生物素磁珠。

7. 混合均匀，在冰箱(2 - 8 $^{\circ}\text{C}$)中再孵育 10 分钟。

8. 进行细胞分选步骤。

三、细胞分选：去除非目的细胞

▲ 根据总细胞数和目的细胞数选择合适的分选柱和分选器。

▲ 始终等到分选柱储液器排空后再进行下一步操作。

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 mL 缓冲液冲洗分选柱。收集总流出物；这是未标记的预富集记忆 B 细胞部分。通过添加两次缓冲液来执行洗涤步骤。只有当分选柱储液器排空后才加入新的缓冲液。

5. 继续 IgG1+/IgG2ab+记忆 B 细胞的标记。

四、IgG1+/IgG2ab+记忆 B 细胞的磁性标记

▲ 下面给出的磁性标记体积适用于细胞总数不超过 10^8 的初始细胞数。如果初始细胞数较多，则应相应增加所有容量。

1. 将细胞悬浮液以 $300\times g$ 离心 10 分钟。完全吸出上清液。
2. 用 400 μL 缓冲液重悬细胞颗粒。
3. 加入 100 μL 抗 APC 磁珠。
4. 混匀并在冰箱（2-8 $^{\circ}\text{C}$ ）中避光孵育 15 分钟。
5. 加入 10 倍标记体积的缓冲液清洗细胞，然后 $300\times g$ 离心 10 分钟。完全吸取上清液。
6. 用 500 μL 缓冲液重悬 10^8 细胞。

▲ 注：细胞数越多，缓冲液容量应相应增大。

7. 进行细胞分选。

五、细胞分选：IgG1+/IgG2ab+记忆 B 细胞的阳性分选

▲ 要获得最高纯度，请连续运行两次分选柱。

xM 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 500 μL 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，这是阴选部分。
4. 加 500 μL 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，这是阴选部分，和第三步流出物混合。

5. 将分选柱从分选器中取出，并将其放在合适的收集管上。加入 1 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。
6. （可选）为了增加 IgG1+/IgG2ab+记忆 B 细胞的纯度，洗脱的部分可以在第二个 xM 柱上富集。使用新的分选柱重复步骤 1 至 5 中描述的磁分离过程。