

## CD45 (TIL) 分选磁珠，小鼠(92-01-0179)

### [组分]

CD45 (TIL) 磁珠，小鼠：与单克隆抗小鼠 CD45 抗体偶联的磁珠（同种型：大鼠 IgG2b）。

[规格] 1 mL，可分选  $10^9$  个细胞总量，多达 100 次分离。

[保存形式] CD45 (TIL) 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] 2 - 8 °C 避光保存，请勿冷冻。有效期见试剂外标签。

### [分选原理]

首先，用 CD45 (TIL) 磁珠对 CD45+ 细胞进行磁性标记。然后，将细胞悬浮液装入置于分选器磁场的分选柱中。磁性标记的 CD45+ 细胞被保留在柱中，未标记的细胞顺着分选柱流出。将柱从磁场中移出后，磁性保留的 CD45+ 细胞可作为正选细胞部分被洗脱出来。为了提高纯度，必须在第二根柱上分离含有 CD45+ 细胞的正选细胞部分。

### [背景信息]

CD45 (TIL) 小鼠磁珠已用于从实体小鼠肿瘤的单细胞悬液中分离肿瘤浸润性白细胞(TIL)。CD45 抗原表达于除红细胞和血小板外的所有造血细胞上。

### [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  $\text{Ca}^{2+}$  或  $\text{Mg}^{2+}$  的缓冲液或培养基。
- 分选柱和分选器： CD45 阳性细胞可以用 xM、xL 分选柱富集。
- 肿瘤解离试剂盒，小鼠。
- 组织解离器，全自动组织解离器，或带加热模块的全自动组织解离器。
- (可选) 荧光偶联的抗体用于流式分析。
- ▲ 注意：由于肿瘤浸润白细胞上表达 Fcγ 受体，建议使用 REA 抗体。
- (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

要制备小鼠实体肿瘤的单细胞悬浮液，请使用小鼠肿瘤解离试剂盒。

▲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。

## 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  $2 \times 10^7$  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 5 分钟。去除上清。

3. 每  $10^7$  个细胞总量使用  $90 \mu\text{L}$  缓冲液重悬。

▲ 注意：始终使用新鲜配制的缓冲液。

4. 每  $10^7$  个细胞总量添加  $10 \mu\text{L}$  CD45 (TIL) 磁珠。

5. 混匀， $2-8^\circ\text{C}$  避光孵育 15 分钟。

6. (可选) 根据说明书的建议添加染色抗体。

7. 用  $500 \mu\text{L}$  缓冲液重悬最多  $5 \times 10^7$  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。

## 三、细胞分选

- ▲ 根据总细胞数和 CD45+ 细胞数选择合适的分选柱和分选器。
- ▲ 注：建议使用 xM 柱以获得最高纯度的 CD45+ 细胞。建议使用 xL 柱以获得最高的 CD45+ 细胞回收率。
- ▲ 为了获得最佳性能，在磁分选之前获得单细胞悬浮液非常重要。将细胞通过 30  $\mu$ m 尼龙网（预分离过滤器），去除可能堵塞分选柱的细胞团块。使用前用缓冲液润湿过滤器。
- ▲ 始终等到分选柱储液器排空后再进行下一步操作。

### 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  $\mu$ L                      xL: 3 mL
3. 将细胞悬液转移至分选柱中。收集流出的未标记细胞。
4. 加适量缓冲液洗脱，待液体全部流尽，再加入适量缓冲液。收集总流出物和第三步流出物混合。  
xM: 3 $\times$ 500  $\mu$ L                      xL: 2 $\times$ 1 mL
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. 加适量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。  
xM: 1 mL                              xL: 3 mL
7. (可选) 为了提高 CD45+ 细胞的纯度，可以通过第二个 xM 或 xL 柱富集洗脱部分。使用新分选柱重复步骤 1 至 6 中所述的磁分选过程。