

抗Ly-6G超纯化磁珠，小鼠(92-01-0355)

[组分]

小鼠-Ly-6G 超纯化磁珠：与抗小鼠 Ly-6G 单克隆抗体（同型：人 IgG1）偶联的磁珠。

[规格] 2 mL，可分选 2×10^9 个细胞总量，多达 200 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]

首先，用抗 Ly-6G 超纯化磁珠对 Ly-6G⁺ 细胞进行磁性标记。然后，将细胞悬浮液装入分选柱，再将其置于分选器的磁场中。磁性标记的 Ly-6G⁺ 细胞被保留在柱内，未标记的细胞则流过。从磁场中移除分选柱后，磁性保留的 Ly-6G⁺ 细胞可作为正选细胞部分被洗脱出来。为了提高肺和血液中 Ly-6G⁺ 细胞的纯度，必须用第二个分选柱分离含有 Ly-6G⁺ 细胞的正选细胞部分。

[背景]

抗 Ly-6G 超纯化磁珠是为直接阳选或清除淋巴组织中的小鼠中性粒细胞而开发的。Ly-6G 在中性粒细胞上高度表达，在嗜酸性粒细胞亚群中表达水平较低，并在单核细胞发育阶段短暂表达。本试剂盒含有抗 Ly-6G 克隆 REA526，它与 Fc 受体的结合可忽略不计。

[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。
- (可选) 预分离过滤器去除细胞团块。

[步骤]

一、样本准备

- ▲ 若要从小鼠肺中获得高回收率和纯度的 Ly-6G⁺ 中性粒细胞,建议使用小鼠肺解离试剂盒进行酶解。
- ▲ 处理固体组织时,使用组织解离仪和适当的组织解离试剂盒制备单细胞悬液。
- ▲ 如果使用骨髓、血液或肺单细胞悬液,请参阅第二步磁珠标记。处理血液时,必须在磁性标记前使用红细胞裂解液 (10×) 进行红细胞裂解。

▲ 死细胞可能会与磁珠非特异性结合。要去除死细胞，建议使用密度梯度离心法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。

▲ 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 90 μL 缓冲液重悬。

4. 每 10^7 个细胞总量添加 10 μL 抗 Ly-6G 磁珠。

5. 混匀， $2-8^\circ\text{C}$ 孵育 10 分钟。

6. 每 10^7 个细胞加入 1-2 mL 缓冲液洗涤细胞， $300 \times g$ 离心 10 分钟，去上清。

7. 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。

8. 进行细胞分选步骤。

三、细胞分选

- ▲ 根据总细胞数和 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 μ L xL: 3 mL

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. 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。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 3 步的流出液混合。

xM: 3 \times 500 μ L xL: 3 \times 3 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: 5 mL

7. (可选) 为了提高 Ly-6G+ 细胞的纯度，洗脱的部分可以在第二个 xM 或 xL 柱上富集。用新的分选柱重复步骤 1 至 6 中描述的磁分选过程。