

CD140a (PDGFR α)分选磁珠试剂盒，小鼠(92-01-0364)

[组分]

50 μ L 小鼠 CD140a (PDGFR α)磁珠：与抗小鼠 CD140a (PDGFR α)单克隆抗体（同型：大鼠 IgG2b）偶联的磁珠。

50 μ L FcR 阻断试剂，小鼠

[规格]可分选 5×10^7 个细胞总量，多达 5 次分离。

[保存形式] 所有试剂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 $^{\circ}$ C 避光保存，请勿冻存。有效期见试剂外标签。

[分选原理]

首先，用小鼠 FcR 阻断试剂阻断 Fc 受体。然后，用 CD140a (PDGFR α) 磁珠对 CD140a (PDGFR α)+ 细胞进行磁性标记。将细胞悬浮液装入分选柱，分选柱置于分选器磁场中。磁性标记的 CD140a (PDGFR α) 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 CD140a (PDGFR α)细胞可作为正选细胞部分被洗脱出来。为了提高纯度，含有 CD140a (PDGFR α)+ 细胞的正选部分可在第二个分选柱上分离。

[背景信息]

CD140a (PDGFR α) 分选磁珠 (PDGFR α : 血小板衍生生长因子受体 α) 是根据 CD140a (PDGFR α) 抗原的表达而开发的, 用于分离小鼠细胞。据报道, CD140a (PDGFR α) 在胚胎组织、各种恶性肿瘤和胚胎干细胞衍生的心肌细胞中广泛表达。

CD140a (PDGFR α) 分选磁珠根据 CD140a (PDGFR α) 的表达进行了特别优化, 用于分离少突胶质细胞祖细胞 (OPC)。这种分离方法特别在出生后 8 天以下的小鼠分离的产后 CD1 小鼠脑组织中进行测试 (P8)。原则上, 也可以从年龄较大的小鼠身上分离细胞, 但由于组织解离后 CD140a (PDGFR α) 阳性细胞的频率较低, 阳性部分的纯度可能较低。

为获得最佳结果, 建议在细胞分离前使用神经组织解离试剂盒 (P)。

[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) 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: 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。
- 神经组织解离试剂盒(P)被推荐用于从小鼠脑组织中产生神经细胞的单细胞悬液。
- ▲ 注意: 如果其他感兴趣的细胞表面表位是木瓜蛋白酶敏感的, 可以使用神经组织解离试剂盒(T)。
- 分选柱和分离器。
- (可选) 荧光偶联的抗体用于流式分析。
- (可选) 人 PDGF-AA, 研究级, 小鼠 FGF-2, 研究级
- (可选) PI 或 7-AAD 可以用于流式分析中排除死细胞。
- (可选) 神经培养基和 NeuroBrew-21 添加剂用于培养。

- (可选) 组织解离仪。
- 预分离过滤器去除细胞团块。

[步骤]

一、样本准备

关于神经组织单细胞悬液的制备，请参阅神经组织解离试剂盒（P）的说明书，该试剂盒可与组织解离器结合使用。

▲ 注：如果其他细胞表面表位对木瓜蛋白酶敏感，可使用神经组织解离试剂盒（T）。

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。为了获得最佳性能，建议至少使用 5×10^6 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。将细胞通过 $70 \mu\text{m}$ 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。

▲ 建议孵育温度为 $2-8^\circ\text{C}$ 。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 80 μL 缓冲液重悬。
 4. 每 10^7 个细胞总量使用 10 μL FcR 阻断试剂重悬。
 5. 混匀，不要涡旋。2-8 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 分钟。
 6. 每 10^7 个细胞总量添加 10 μL CD140a (PDGFR α)磁珠。
 7. 混匀，不要涡旋。2-8 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 分钟。
 8. 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。
 9. 用 500 μL 缓冲液重悬最多 10^7 个细胞。
- ▲ 注：细胞数量增多需相应地增加缓冲液的体积。
10. 进行细胞分选步骤。

三、细胞分选

- ▲ 根据总细胞数和 CD140a (PDGFR α)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。

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 μL 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 μL 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) 为提高 CD140a (PDGFR α) + 细胞的纯度，可在第二个 xM 或 xL 柱上富集洗脱部分。

使用新的分选柱，重复步骤 1 至 6 所述的磁分离步骤。

▲ 注意：分离后的细胞如果要直接放入培养液中培养，应使用细胞培养液进行洗脱，否则应使用缓冲液进行洗脱。

▲ 注意：尽量减少细胞在 PBS/BSA 缓冲液中的处理时间。

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. 将细胞悬浮液加载到分选柱上。

4. 收集通过的未标记细胞，用 2×1 mL 缓冲液冲洗分选柱。收集总流出液，这是未标记的细胞部分。

通过添加两次缓冲液来执行清洗步骤。只在分选柱储液槽排空时添加新的缓冲液。