

CD146 (LSEC)分选磁珠，小鼠(92-01-0078)

[组分]

小鼠 CD146 (LSEC) 磁珠：与抗小鼠 LSEC 单克隆抗体（同型：大鼠 IgG2a）偶联的磁珠。

[规格] 2 mL，可分选 2×10^9 个细胞总量，多达 200 次分离。

[保存形式] CD146 (LSEC) 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，请勿冻存。有效期见试剂外标签。

[分选原理]

首先，用 CD146 (LSEC) 磁珠对肝窦状内皮细胞进行磁性标记。然后，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 LSEC 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 LSEC 细胞可作为正选细胞部分被洗脱出来。

[背景信息]

CD146 是一种跨膜糖蛋白，属于细胞粘附分子的 IgG 超家族 CD146 (LSEC) 抗体与小鼠肝窦内皮细胞 (LSECs) 结合，后者是肝窦壁内的微血管内皮细胞，主要有助于控制对肝脏中循环可溶性抗原的免疫应答。他们的战略定位有利于与通过肝脏迁移的淋巴细胞的紧密相互作用。LSEC 具有较高的抗原摄取和加工能力，但与专业抗原呈递细胞（如树突状细胞）相比，仅表达低水平的共刺激分子。CD146 (LSEC) 抗体还与来自各种器官的内皮细胞结合，例如皮肤，肝脏，肾脏，脑，脾，淋巴结，肠，心脏和骨骼肌以及血管结构，例如肺动脉，静脉和肺泡壁的毛细血管网，但不是淋巴管内皮。与

在 T 细胞或滤泡树突细胞上也表达 CD146 的人相反，鼠 CD146 表达仅在低水平的 NK1.1⁺ 细胞亚群中发现。

[试剂和仪器要求]

- 缓冲液： 配制含有 pH 7.2 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：CD146 阳性细胞可以用 xM、xL 分选柱富集。
- 肝脏解离试剂盒，小鼠
- (可选) 荧光偶联的 CD146 抗体用于流式分析。
- (可选) FcR 阻断试剂，小鼠
- (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

使用组织离解器，按照小鼠肝脏解离试剂盒的说明书离解小鼠肝脏。

▲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 $30\ \mu\text{m}$ 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 10^7 个细胞总量使用 $90\ \mu\text{L}$ 缓冲液重悬。
4. 每 10^7 个细胞总量添加 $10\ \mu\text{L}$ CD146 (LSEC)磁珠。
5. 混匀， $2-8\ ^\circ\text{C}$ 孵育 15 分钟。
6. (可选) 添加染色抗体，例如： $10\ \mu\text{L}$ CD146 (LSEC)-FITC $2-8\ ^\circ\text{C}$ 避光孵育 5 分钟。
7. 每 10^7 个细胞加入 $1-2\ \text{mL}$ 缓冲液洗涤细胞， $300 \times g$ 离心 10 分钟，去上清。
8. 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。



9. 进行细胞分选步骤。

三、细胞分选

▲ 根据总细胞数和 CD146+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 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: 3×500 μ L

xL: 3×3 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