

## 中性粒细胞分选试剂盒，小鼠(92-01-0144)

### [组分]

1 mL 小鼠中性粒细胞生物素抗体混合物：针对不在中性粒细胞粒细胞上表达的抗原的生物素偶联单克隆抗体的混合物。

2 mL 抗生物素磁珠：与抗生物素单克隆抗体（同型：小鼠 IgG1）偶联的磁珠。

[规格] 可分选  $10^9$  个细胞总量，多达 20 次分离。

[保存形式] 所有组分均储存在含有稳定剂和 0.05% 叠氮化钠的缓冲液中。

[储存条件]  $2 - 8^{\circ}\text{C}$  避光保存，请勿冷冻。有效期见试剂外标签。

### [分选原理]

使用中性粒细胞分选试剂盒可通过去除非目的细胞来分选小鼠中性粒细胞。非目的细胞用生物素结合的单克隆抗体混合物（作为一级标记试剂）和与磁珠结合的抗生物素单克隆抗体（作为二级标记试剂）进行间接磁性标记。将磁性标记的非目的细胞保留在分选柱中，使其处于分选器的磁场中，从而去除磁性标记的非目的细胞，而未标记的中性粒细胞则流过分选柱。

### [背景信息]

中性粒细胞分离试剂盒开发用于从小鼠骨髓或血细胞悬浮液中分离未经标记的中性粒细胞。中性粒细胞对宿主防御入侵病原体至关重要。它们是吞噬性多核细胞，其使用多种毒性剂（包括活性氧物质，抗微生物肽和蛋白酶）吞噬和降解微生物。此外，中性粒细胞可以产生抗炎分子和促进炎症消退因子。

## [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。
- 分选柱和分离器： 根据标记的细胞数和总细胞数选择合适的分选器和分选柱。在处理骨髓时，为了获得最佳的纯度和回收率，强烈建议使用 xL 柱。当处理外周血时，强烈建议使用 xM 柱。
- (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

当处理淋巴器官或非淋巴组织时，使用手工方法或组织解离器制备单细胞悬液。

当处理外周血时，需要在磁性标记之前裂解红细胞。

▲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  $5 \times 10^7$  个细胞总量。当处理少于  $5 \times 10^7$  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  $10 \times 10^7$  总细胞，使用所有指示试剂体积和总体积的两倍体积)。
- ▲ 处理外周血时，磁性标记的体积不应小于  $100 \mu\text{L}$ 。
- ▲ 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  $5 \times 10^7$  个细胞总量使用  $200 \mu\text{L}$  缓冲液重悬。
4. 每  $5 \times 10^7$  个细胞总量添加  $50 \mu\text{L}$  生物素抗体混合物。
5. 混匀， $2-8^\circ\text{C}$  孵育 10 分钟。
6. 每  $5 \times 10^7$  细胞加入  $5-10\text{mL}$  缓冲液洗涤细胞，并在  $300 \times g$  离心 10 分钟。去除上清。
7. 每  $5 \times 10^7$  个细胞使用  $400 \mu\text{L}$  缓冲液重悬。
8. 每  $5 \times 10^7$  个细胞添加  $100 \mu\text{L}$  抗生物素磁珠。
9. 混匀， $2-8^\circ\text{C}$  孵育 15 分钟。
10. 每  $5 \times 10^7$  个细胞添加  $5-10\text{mL}$  缓冲液清洗细胞， $300 \times g$  离心 10 分钟，去上清。
11. 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。

12. 进行细胞分选步骤。

### 三、细胞分选

▲ 根据总细胞数和中性粒细胞数选择合适的分选柱和分选器。

▲ 注：在处理骨髓时，为了获得最佳的纯度和回收率，强烈建议使用 xL 柱。当处理外周血时，强烈建议使用 xM 柱。

▲ 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。收集流下来的包含未标记的细胞，代表的是富集的中性粒细胞。

4. 加适量的缓冲液洗脱，待液体全部流尽，再加入适量缓冲液，一共洗 3 次。收集总流出物和第三步流出物放在一起。

xM: 3 $\times$ 500  $\mu$ L

xL: 3 $\times$ 3 mL

5. （可选）将分选柱从分选器中取出，并将其放在合适的收集管上。将适量的缓冲液加入分选柱，将柱塞用力推下，立即冲洗出磁性标记的非中性粒细胞。

xM: 1 mL

xL: 5 mL