

DC快速预富集试剂盒，人(92-01-0153)

[组分] 2 mL Pan-DC 生物素抗体混合物，人：针对树突状细胞不表达的抗原的单克隆抗体偶联生物素的混合物。

2 mL Pan-DC 磁珠抗体混合物，人：针对树突状细胞不表达的抗原的单克隆抗体偶联磁珠和与单克隆抗生物素抗体（同种型：小鼠 IgG1）偶联的磁珠的混合物。

1 mL FcR 封闭试剂，人：人 Ig。

[规格] 可分选 2×10^9 总细胞数，总计 20 次分选。

[保存形式] Pan-DC 生物素抗体混合物和 Pan-DC 磁珠抗体混合物保存在含有稳定剂和 0.05% 叠氮钠的溶液中。

[储存条件] 在 2—8°C 条件下避光保存，请勿冻存。保质期见瓶子标签。

[分选原理]

使用 Pan-DC 富集试剂盒，通过去除非靶细胞（阴性选择）来分选人树突状细胞（MDC1s、MDC2s 和 PDCs）。非靶细胞用生物素偶联的单克隆抗体混合物（作为主要标记试剂）和与磁珠偶联的抗生物素单克隆抗体（作为辅助标记试剂）进行间接磁性标记。

此外，非靶细胞直接针对树突状细胞不表达的抗原的抗体混合物进行磁性标记。磁性标记的非靶细胞通过将其保留在分选器磁场中的分选柱内，而未标记的 DC 则穿过分选柱。

[试剂和设备]

- 缓冲液：含有 pH7.2、0.5%BSA 和 2mM EDTA 的溶液。保持缓冲液冷却状态(2—8°C)。

▲注：EDTA 可以被其他取代，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 可以被其他蛋白质取代，如人血清白蛋白、人血清或胎牛血清。不建议使用含有钙离子或镁离子的缓冲液或培养基。

- 分选柱和分离器：DC 细胞 xL 柱(阳性选择)进行富集。也可以使用自动分选器进行选择。
- (可选)用于流式细胞术分析的荧光偶联抗体。
- (可选)PI(碘化丙啶)或 7-AAD 用于流式细胞术排除死亡细胞。
- (可选)用于去除细胞团的预分离过滤器。

[1. 样本制备]

使用标准方法从淋巴器官、非淋巴组织或外周血中制备单细胞悬浮液。

▲注：死亡细胞可能非特异性地结合到磁珠上。要去除死细胞，我们建议使用密度梯度离心法或死细胞去除试剂盒。

[2. 磁性标记]

▲过程操作速度要快，试剂需提前预冷。可以减少非特异性细胞标记。

▲磁性标记的体积最多可达 10^8 个细胞。少于 10^8 个细胞时，请使用标示的相同体积。当处理更多的细胞时，相应地放大所有试剂体积 (例如，对于 2×10^8 个总细胞，使用标示试剂体积的两倍)。

▲为了获得最佳性能，在磁分选之前获得单细胞悬液是很重要的。通过预分离过滤器去除可能堵塞分选柱的细胞团块。

▲ 建议孵育温度为 20–22 °C。

尽管如此，所有步骤均使用预冷缓冲液 (2–8°C) 。较高的温度和/或较长的孵育时间可能会导致非特异性细胞标记。在冰上工作可能需要增加孵育时间。

1. 细胞计数。
2. 细胞离心，300g，10min，去除上清。
3. 每 10^8 细胞，用 350 μ L 缓冲液重悬。
4. 每 10^8 细胞，用 50 μ L FcR 封闭试剂混匀。

5. 每 10^8 总细胞添加 100 μ L Pan DC 生物素抗体混合物。
6. 充分混合并在室温下孵育 5 分钟。
7. 每 10^8 细胞，加入 400 μ L 缓冲液。
8. 每 10^8 总细胞添加 100 μ L Pan DC 磁珠抗体混合物。
9. 充分混合并在室温下孵育 5 分钟。
10. 每 10^8 细胞添加 10 mL 缓冲液洗涤细胞，并以 $300\times g$ 离心 10 分钟。完全吸出上清液。
11. 在 500 μ L 缓冲液中重悬最多 10^8 细胞。
12. 进行磁分选。

[3. 磁性分选]

▲ 根据总细胞数和标记细胞数选择合适的分选柱和分选器。

1. 将分选柱放置在分选器的磁场中。
2. 将分选柱中加入适量缓冲液，充分湿润分选柱：

xM: 500 μ L xL: 3 mL

3. 将细胞悬液加到分选柱中。

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。这是未标记的细胞，代表富集的树突细胞部分。

xM: $3\times 500 \mu$ L xL: 3×3 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。
6. （可选）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非目标细胞。

xM: 1 mL xL: 5 mL