

## CD303(bdca-2) 分选磁珠试剂盒，人(92-01-0275)

**[组分]** 1 mL CD303 (BDCA-2)-生物素抗体，人：生物素偶联的抗人 CD303 (BDCA-2) 抗体（同种型：小鼠 IgG1；克隆：AC144）。

2 mL 抗生物素磁珠：与单克隆抗生物素抗体（同种型：小鼠 IgG1）偶联的磁珠。

2 mL FcR 封闭试剂，人：人 Ig。

**[规格]** 可分选  $10^9$  总细胞数，总计 10 次分选。

**[保存形式]** 所有组分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]**

首先，CD303 (BDCA-2)+细胞用 CD303 (BDCA-2)-生物素和抗生物素磁珠间接磁性标记。然后，将细胞悬浮液加到分选柱上，该分选柱置于分选器的磁场中。磁性标记的 CD303 (BDCA-2)+ 细胞保留在柱内。未标记的细胞贯穿其中。从磁场中取出分选柱后磁性标记的 CD303 (BDCA-2)+ 细胞可以作为阳性选择的细胞部分洗脱。

### **[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：目的细胞 xM 柱、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]

当使用抗凝外周血或白膜层时，应通过密度梯度离心分离外周血单个核细胞 (PBMC)。

▲ 注意：要在密度梯度分离后去除血小板，请将细胞沉淀重悬于缓冲液中，并在 20°C 下以 200×g 离心 10–15 分钟。小心吸出上清液。重复洗涤步骤。

▲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  $2 \times 10^8$  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。

▲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 100  $\mu$ L 缓冲液重悬。
4. 每  $10^8$  细胞，用 50  $\mu$ L FcR 封闭试剂混匀。
5. 每  $10^8$  总细胞添加 100  $\mu$ L CD303 (BDCA-2)-生物素抗体。
6. 充分混合并在冰箱 (2–8 °C) 下孵育 5 分钟。
7. 每  $10^8$  细胞，加入 400  $\mu$ L 缓冲液。
8. 每  $10^8$  总细胞添加 150  $\mu$ L FcR 封闭试剂。
9. 每  $10^8$  总细胞添加 200  $\mu$ L 抗生物素磁珠。

10. 充分混合并在冰箱 (2–8 °C) 孵育 15 分钟。
  11. (可选) 孵育 10 分钟后添加染色抗体, 例如添加 100  $\mu\text{L}$  CD304 (BDCA-4)-APC, 并在冰箱 (2–8 °C) 中避光孵育 5 分钟。
  12. 每  $10^8$  细胞添加 10–20 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。
  13. 在 500  $\mu\text{L}$  缓冲液中重悬最多  $10^8$  细胞。
- ▲ 注意: 对于更高的细胞数量, 请相应地增加缓冲液体积。
14. 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  $\mu\text{L}$                       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。  
xM:  $3 \times 500 \mu\text{L}$                       xL:  $3 \times 3 \text{ mL}$
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目标细胞。  
xM: 1 mL                      xL: 5 mL