

CD304(BDCA-4/神经纤毛蛋白-1) 分选磁珠试剂盒, 人(92-01-0277)

[组分] 2 mL CD304 (BDCA-4/Neuropilin-1) 磁珠, 人: 与单克隆抗人 CD304 (BDCA-4/Neuropilin-1) 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 2×10^9 总细胞数, 总计 20 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, CD304 (BDCA-4/Neuropilin-1)+细胞用 CD304 (BDCA-4/Neuropilin-1)磁珠标记。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 CD304 (BDCA-4/Neuropilin-1)+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 CD304 (BDCA-4/Neuropilin-1)+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 2×10^8 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 300 μ L 缓冲液重悬。
4. 每 10^8 细胞，用 100 μ L FcR 封闭试剂混匀。
5. 每 10^8 总细胞添加 100 μ L CD304 (BDCA-4/Neuropilin-1) 磁珠。
6. 充分混合并在冰箱 (2–8 °C) 下孵育 15 分钟。
7. (可选) 孵育 10 分钟后添加染色抗体，例如添加 50 μ L CD303 (BDCA-2)-FITC 并在冰箱 (2–8 °C) 中避光孵育 5 分钟。
8. 每 10^8 细胞添加 5–10 mL 缓冲液洗涤细胞，并以 300×g 离心 10 分钟。完全吸出上清液。
9. 在 500 μ 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。

10. 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。

xM: 3 \times 500 μ L 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目标细胞。

xM: 1 mL xL: 5 mL