

## GLAST (ACSA-1)分选磁珠试剂盒，人，小鼠，大鼠(92-01-0299)

### [组分]

1 mL 抗 GLAST (ACSA-1) -生物素，人、小鼠、大鼠：与生物素结合的单克隆抗 GLAST (ACSA-1) 抗体（同种型：小鼠 IgG2a）。

1 mL 抗生物素磁珠：与单克隆抗生物素抗体（同种型：小鼠 IgG1）结合的磁珠。

[规格] 2 × 1 mL，可分选  $5 \times 10^8$  个细胞总量，多达 50 次分离。

[保存形式] 所有试剂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，请勿冷冻。有效期见试剂外标签。

交叉反应：经测试，抗 GLAST (ACSA-1) 磁珠试剂盒可与小鼠和大鼠细胞发生反应。免疫组化法已成功测试了抗 GLAST (ACSA-1) 抗体与人体细胞的交叉反应性。

### [分选原理]

首先，用 GLAST (ACSA-1)-生物素抗体和抗生物素磁珠间接磁性标记 GLAST + 细胞。然后，将细胞悬浮液装载到分选柱上，该分选柱置于分选器的磁场中。磁性标记的 GLAST + 细胞保留在柱内，未标记的细胞顺着分选柱流出。将分选柱移出磁场后，磁性保留的 GLAST + 细胞可以作为正选细胞部分被洗脱。为了提高纯度，含有 GLAST + 细胞的阳选细胞部分可以在第二个柱上分离。

### [背景信息]

抗 GLAST (ACSA-1) 磁珠试剂盒 (ASCA-1: 星形胶质细胞表面抗原-1) 是根据 GLAST 的表达而开发的, 用于分离星形胶质细胞。

抗 GLAST (ACSA-1) 抗体对星形胶质细胞特异性跨膜糖蛋白 GLAST 的细胞外表位具有特异性。

GLAST 是一种 Na<sup>+</sup> 依赖性 L-谷氨酸转运体, 对于从细胞外空间清除兴奋性神经递质 L-谷氨酸以维持正常生理水平非常重要。

除了 GLT-1 之外, GLAST 是最丰富的谷氨酸转运体, 主要由发育中和新生哺乳动物中枢神经系统中的星形胶质细胞表达。此外, 属于星形胶质细胞系并在发育过程中发挥重要作用的放射状胶质细胞也表达 GLAST。出生后放射状胶质细胞只在少数区域存在, 如小脑中的伯格曼胶质、视网膜中的缪勒胶质和成年海马齿状回中的放射状胶质细胞。

GLAST<sup>+</sup> 细胞的分离在 CD1 小鼠的 P5-7 (出生后第 5-7 天) 离体小鼠脑组织上进行了测试, 其中含有约 12-18% 的 GLAST<sup>+</sup> 细胞。

### [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)。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: 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。

▲ 注: 始终使用新鲜配制的缓冲液。

● 分选柱和分选器: GLAST<sup>+</sup>细胞可以用 xM、xL 分选柱富集。

● 神经组织分离试剂盒(T)

● (可选) 组织解离器, 全自动组织解离器或带加热模块的全自动组织解离器。

- (可选) FcR 阻断剂，小鼠
- (可选) 荧光偶联的 GLAST(ACSA1)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) 预分离过滤器去除细胞团块。

## [步骤]

### 一、样本准备

处理神经组织时，使用手动方法或温和的组织分离器制备单细胞悬液。由于 GLAST 表位对木瓜蛋白酶敏感，建议使用胰蛋白酶解离法。有关详情，请参阅神经组织解离试剂盒 (T) 的说明书。

### 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，使用与指示相同的试剂体积。为了获得最佳性能，至少使用  $5 \times 10^6$  个细胞数。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  $2 \times 10^7$  总细胞，使用所有指示试剂体积和总体积的两倍体积)。
  - ▲ 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  $70 \mu\text{m}$  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 80  $\mu\text{L}$  缓冲液重悬。

▲ 注：如果使用 FcR 阻断试剂，小鼠，每  $10^7$  有核细胞加入 70  $\mu\text{L}$  缓冲液和 10  $\mu\text{L}$  FcR 阻断试剂，小鼠。混匀，不要旋涡，2-8°C 孵育 10 分钟。

4. 每  $10^7$  细胞总量加入 20  $\mu\text{L}$  抗 GLAST (ACSA-1) 生物素。

5. 混匀。不要涡旋。2-8°C 孵育 10 分钟。

6. 每  $10^7$  个细胞加入 1-2 mL 缓冲液洗涤细胞，300 $\times$ g 离心 10 分钟，去上清。

7. 每  $10^7$  个细胞总量加入 80  $\mu\text{L}$  缓冲液。

8. 每  $10^7$  个细胞总量添加 20  $\mu\text{L}$  抗生物素磁珠。

9. 混匀，不要涡旋，2-8 °C 孵育 15 分钟。

10. 每  $10^7$  个细胞加入 1-2 mL 缓冲液洗涤细胞，300 $\times$ g 离心 10 分钟，去上清。

11. 用 500  $\mu\text{L}$  缓冲液重悬最多  $10^7$  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

▲ 始终等到分选柱储液器排空后再进行下一步操作。

▲ 为了获得最高的纯度，GLAST+细胞的纯化应该用两个连续的 xM 柱进行。

▲ 与 xM 柱相比，xL 柱的使用可能导致纯度降低 5-10%。

#### 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。收集流出的未标记细胞。

4. 加适量缓冲液洗脱，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混合，这是 GLAST 阴性细胞。

xM: 3 $\times$ 500  $\mu$ 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，得到就是目的细胞。

xM: 1 mL

xL: 5 mL

▲ (可选)为了提高 GLAST+细胞的纯度，洗脱的部分可以在第二个 xM 或 xL 柱上富集。用新的分选柱重复步骤 1 至 6 中描述的磁分选过程。

▲ 注：分离后的柱上细胞如需直接入培养，需用细胞培养基洗脱，否则照例用缓冲液洗脱。

▲ 注：尽量减少 PBS/BSA 缓冲液中细胞的处理时间。