

Pan B细胞分选试剂盒，小鼠(92-01-0120)

[组分]

1 mL Pan B 细胞生物素抗体混合物，小鼠：抗 CD4、CD11c、CD49b、CD90.2、Gr-1 和 Ter119 的单克隆小鼠抗体偶联生物素混合物。

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

[规格] 可分选 10^9 个细胞总量。多达 100 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 °C 避光保存，请勿冷冻。有效期见试剂外标签。

[分选原理]

使用 Pan B 细胞分选试剂盒，通过去除非靶细胞来分选小鼠 B 细胞。非 B 细胞用生物素抗体混合物作为一级标记试剂，将与磁珠偶联的抗生物素单克隆抗体作为二级标记试剂进行间接性磁标记。在两个标记步骤之间不需要洗涤步骤。磁性标记的非 B 细胞留在分选柱内，而未标记的 B 细胞则穿过分选柱流出。

[背景信息]

该试剂盒可用于从淋巴组织单个细胞悬液中非接触性分离 B-1 和 B-2B 细胞亚群。该试剂盒不包含去除混合物中可能在一些恶性靶细胞上表达的针对 CD43 或 CD11b 的生物素偶联抗体。因此，它非常适合用于从人类疾病的不同小鼠模型中分离 B 细胞，例如从 B-CLL 小鼠模型中分离 B 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）和 2 mM EDTA 的溶液。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 Ca^{2+} 或 Mg^{2+} 的缓冲液或培养基。

●（可选）FcR 封闭试剂，小鼠，可以避免 Fc 受体介导的抗体标记。

● 分选柱和分选器。

●（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）预分离过滤器去除细胞团块。

●（可选）处理小鼠血液样本时使用红细胞裂解液。

[步骤]

一、样本准备

在处理淋巴器官、非淋巴组织或外周血时，使用标准方法制备单细胞悬液。

当使用小鼠血液样本时，根据红细胞裂解液（10×）的方案，在磁标记前裂解红细胞。

▲死细胞可能与磁珠非特异性结合。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。

二、磁珠标记

▲ 快速工作，保持细胞低温，并使用预冷溶液（2-8℃），将防止细胞表面的非特异性标记。

▲ 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。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 2×10^7 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 $30\ \mu\text{m}$ 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。

1. 细胞计数。
2. $300 \times g$ 离心 10 分钟。去除上清液。
3. 每 10^7 个细胞总量使用 $40\ \mu\text{L}$ 缓冲液重悬。
4. 每 10^7 个细胞总量添加 $10\ \mu\text{L}$ Pan B 生物素抗体混合物。
5. 充分混匀，2-8℃ 孵育 5 分钟。
6. 每 10^7 个细胞总量添加 $30\ \mu\text{L}$ 缓冲液。
7. 每 10^7 个细胞加入 $20\ \mu\text{L}$ 抗生物素磁珠。
8. 充分混匀，2-8℃ 孵育 10 分钟。
9. 将缓冲液体积调整至最少 $500\ \mu\text{L}$ 。

▲ 注意：用 $500\ \mu\text{L}$ 缓冲液重悬最多 10^8 个细胞，细胞数量增多需相应地增加缓冲液的体积。

10. 进行细胞分选。

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。

使用分选 LD 柱进行分选

1. 将 LD 分选柱置于合适的分选器中。
2. 用 2mL 缓冲液润洗分选柱。
3. 将细胞悬液转移至分选柱中。
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 1mL 缓冲液，待液体全部流尽，再加入 1mL 缓冲液。收集总流出物，这是未标记的 Pan B 细胞。
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 3mL 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 B 细胞。