

小鼠细胞去除试剂盒(92-01-0164)

[组分]

小鼠细胞去除混合物

[规格] 2 mL，可分选 2×10^8 肿瘤细胞或 10^9 个细胞总量（包括红细胞），多达 100 次分离。

[保存形式] 小鼠细胞去除试剂盒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]

首先，用与磁珠结合的单克隆抗体混合物对小鼠细胞进行磁性标记。然后，将细胞悬浮液装入分选柱，该分选柱置于分选器的磁场中。磁性标记的小鼠细胞被保留在柱中，未标记的人源细胞则流出。将柱从磁场中移出后，磁性标记的小鼠细胞就可以被洗脱出来。

[背景信息]

小鼠细胞去除试剂盒专为异种移植后富集未标记的人细胞而设计。人肿瘤异种移植代表了研究领域的基准，例如药物发现，癌症干细胞生物学和转移预测。在体内的生长阶段，异种移植的组织通过小鼠起源的细胞（包括异种淋巴细胞亚群，成纤维细胞和内皮细胞）被血管化和浸润。浸润水平高度取决于多种因素，例如肿瘤亚型，生长速率和移植区域。但是，即使将这些因素保持恒定，浸润小鼠细胞的数量和组成也高度可变，这使得精确的分子下游分析变得困难。污染的小鼠细胞导致小鼠衍生的分子与微阵列上的人类探针交叉杂交，并且在下一代测序或蛋白质组分析过程中由于测量小鼠信号而导致

致灵敏度大大降低。另外，人肿瘤细胞的培养经常受到靶细胞过度生长的鼠成纤维细胞的阻碍。为了获得最佳结果，应将小鼠细胞去除试剂盒与人类肿瘤分离试剂盒组合使用。

[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）的溶液。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。始终使用新鲜配制的缓冲液。
- 分选柱和分选器： 为了获得最佳纯度和回收率，强烈建议使用 xL 柱。
- 肿瘤分离试剂盒，人
- 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) 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。

[步骤]

一、样本准备

为了制备来自异种移植肿瘤的单细胞悬浮液，使用人肿瘤解离试剂盒并与组织解离器联合使用。

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 2×10^6 个肿瘤细胞或 10^7 个细胞总量（包含红细胞）。当处理更少的细胞时，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 4×10^6 个肿瘤细胞或 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。

▲ 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 2×10^6 个肿瘤细胞或 10^7 个细胞总量（包含红细胞）使用 $80\ \mu\text{L}$ 缓冲液重悬。
4. 每 2×10^6 个肿瘤细胞或 10^7 个细胞总量（包含红细胞）添加 $20\ \mu\text{L}$ 小鼠细胞去除混合物。
5. 混匀， $2-8\ ^\circ\text{C}$ 孵育 15 分钟。
6. (可选) 根据说明书推荐，添加染色抗体。
7. 调整体积至 $500\ \mu\text{L}$ 重悬最多 2×10^6 个肿瘤细胞或 10^7 个细胞总量。

▲ 注：最多 1×10^7 个肿瘤细胞或 5×10^7 个总细胞可以在一个 xL 分选柱上处理。如果使用更多的细胞，将样品拆分到多个 xL 柱上。

8. 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。



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 3 mL 的缓冲液润洗分选柱。
3. 将细胞悬液转移至分选柱中。收集包含未标记细胞的流出液，这是人肿瘤细胞。
4. 加 1 mL 的缓冲液洗脱，待液体全部流尽，再加入适量缓冲液，一共洗 2 次。收集总流出物，这是人肿瘤细胞，和第三步流出物混合。
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）加入 3 mL 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小鼠细胞。