

CD49b (DX5) 分选磁珠, 小鼠(92-01-0045)

[组分]

小鼠 CD49b (DX5) 磁珠：与抗小鼠 NK 细胞 (DX5; 同型: 大鼠 IgM; 克隆: DX5) 单克隆抗体偶联的磁珠。

[规格] 2 mL, 可分选 2×10^9 个细胞总量, 多达 200 次分离。

[保存形式] CD49b (DX5) 磁珠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, 请勿冻存。有效期见试剂外标签。

[分选原理]

首先, 用 CD49b (DX5) 磁珠对 CD49b (DX5) + 细胞进行磁性标记。然后, 将细胞悬浮液装入置于分选器磁场的分选柱中。磁性标记的 CD49b (DX5) + 细胞被保留在柱中, 未标记的细胞顺着分选柱流出。将柱从磁场中移出后, 磁性保留的 NK 细胞可作为正选细胞部分被洗脱出来。

[背景信息]

小鼠 CD49b (DX5) 磁珠用于从淋巴组织和非淋巴组织的单细胞悬液以及外周血或体液中分离小鼠 NK 细胞。这种磁珠以前称为抗 NK 细胞 (DX5) 磁珠。CD49b 在 NK 细胞和一小部分 T 细胞 (CD4+CD3+TCR $\alpha\beta$ +) 上表达。在富集 NK 细胞之前, 可使用 CD90 (Thy1.2) 磁珠或 CD5 磁珠清除这些细胞。与其他 NK 细胞标记物 (如 NK1.1) 相比, CD49b 对小鼠品系的特异性较低, 最常见的近交系小鼠品系都能表达 CD49b。

[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。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：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，例如明胶、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。
- 分选柱和分选器：CD49b 阳性细胞可以用 xM、xL 分选柱富集。强烈表达 CD49b 抗原的细胞也可以用 xM、xL 分选柱去除。
- (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

用标准方法从淋巴器官、非淋巴组织或外周血中制备单细胞悬液。

▲ 注：死细胞可能与磁珠非特异性结合。为了去除死细胞，我们建议使用密度梯度离心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，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。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。
3. 每 10^7 个细胞总量使用 $90\ \mu\text{L}$ 缓冲液重悬。
4. 每 10^7 个细胞总量添加 $10\ \mu\text{L}$ CD49b(DX5) 磁珠。
5. 混匀， $2-8\ ^\circ\text{C}$ 孵育 15 分钟。

▲ 注：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。

6. (可选) 添加染色抗体，根据说明书推荐添加 CD49b 荧光抗体 $2-8\ ^\circ\text{C}$ 避光孵育 5 分钟。
7. 每 10^7 个细胞加入 $1-2\ \text{mL}$ 缓冲液洗涤细胞， $300 \times g$ 离心 10 分钟，去上清。
8. 用 $500\ \mu\text{L}$ 缓冲液重悬最多 10^8 个细胞。

▲ 注：细胞数量增多需相应地增加缓冲液的体积。

9. 进行细胞分选步骤。

三、细胞分选

▲ 根据总细胞数和 CD49b+细胞数选择合适的分选柱和分选器。



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 μ L

xL: 3 mL

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: 3×500 μ L

xL: 3×3 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细胞。

xM: 1 mL

xL: 5 mL

▲ 注：为了提高磁性标记细胞的纯度，可将其通过一个新的分选柱。