

黑色素瘤 (MCSP) 分选磁珠, 人 (92-01-0296)

[组分]

黑色素瘤 (MCSP) 分选磁珠, 人: 与单克隆小鼠抗人黑色素瘤相关硫酸软骨素蛋白多糖 (MCSP) 抗体偶联的磁珠 (克隆: 9.2.27; 同种型: 小鼠 IgG2a)。

[规格] 2 mL, 可分选 10^9 个细胞总量。

[保存形式] 试剂储存在含有 0.1% 明胶和 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]

在进行磁性分选时, 用抗黑色素瘤磁珠对细胞进行磁性标记, 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。磁性标记的黑色素瘤细胞被保留在分选柱中, 而未标记的细胞则流过分选柱。从磁场中移除分选柱后, 磁性标记的黑色素瘤细胞可作为正选细胞部分被洗脱出来。

[背景信息]

抗黑色素瘤磁珠适用于从外周血、造血组织 (淋巴结、骨髓等的单细胞悬液) 和非造血组织 (如皮肤活检的单细胞悬液) 中阳性筛选黑色素瘤细胞。黑色素瘤细胞分离应在 xM 或 xL 分选柱上进行。

[试剂和仪器要求]

磁性富集

- XM 或 XL 分选柱
- 缓冲液：pH 值为 7.2 的磷酸盐缓冲盐水，添加 0.5% 牛血清白蛋白和 2 mM EDTA（见 "注意事项"）。通过施加真空对缓冲液进行脱气。
- 含人 IgG 的 FcR 阻断试剂
- 预分离过滤器或 30 μm 尼龙网

用于从淋巴结中分离黑色素瘤细胞

- 手术刀、镊子和培养皿
- 尼龙网和钢网筛（目数：30 微米）
- 注射器活塞
- HEPES 缓冲细胞培养基
- 胶原酶（如胶原酶）
- DNase（如 DNase I）

从骨髓中分离黑色素瘤细胞

- HEPES 缓冲细胞培养基
- 肝素
- DNase（如 DNase I）

用于固相细胞内染色

- 离心机（如 Hettich）
- 硅烷涂层载玻片，如 Histobond®
- MACS 内染色试剂盒，含用于细胞固定和渗透的内固定剂和内渗透剂

- 单克隆小鼠 IgG1 抗人黑色素瘤抗体, 如单克隆小鼠抗人 Melan-A, 克隆: A103, 同种型: 小鼠 IgG1 和/或克隆 HMB45, 同种型: 小鼠 IgG1
- 抗小鼠 IgG1-碱性磷酸酶, 如山羊抗小鼠 IgG1-碱性磷酸酶或抗小鼠 IgG1-FITC, 如山羊抗小鼠 IgG1-FITC 和单克隆小鼠抗 FITC-碱性磷酸酶。
- pH 值为 7.2 的磷酸盐缓冲液 (PBS)
- SIGMA FASTTM Fast Red TR/Naphtol AS-MX substrate tablets
- Meyer's hemalum solution
- 装片培养基, 如 Faramount 水性装片培养基。

[步骤]

一、样本准备

以下方案介绍了外周血、骨髓和淋巴组织中单细胞悬液的制备, 以及使用磁珠技术对黑色素瘤细胞进行磁性富集。如需对富集的黑色素瘤细胞进行后续检测, 请使用以下方案: 固相细胞内染色和内染色试剂盒或使用黑色素瘤细胞富集和检测试剂盒。

制备外周血细胞

1. 采集 30-50 毫升经抗凝剂 (如乙二胺四乙酸、肝素、枸橼酸盐、ACD-A 或柠檬酸磷酸葡萄糖 (CPD)) 处理的新鲜人血。
2. 用 Ficoll-PaqueTM 密度梯度离心法制备单核细胞。
3. 以每 5×10^7 细胞总量 300 μL 的最终体积重悬细胞团。如果细胞总数少于 5×10^7 , 则使用 300 μL 。进行"磁性标记"。

骨髓细胞的制备

用抽吸针从髂嵴上部或胸骨处抽取 2-10 毫升骨髓，放入装有 2-10 毫升 HEPES 缓冲细胞培养基（即 IMDM）的 50 毫升锥形管中，并补充 100 U/ml 的肝素。骨髓抽吸体积应与培养基体积大致相同。

1. (可选) 用一体积含 100 U DNase I/ml 的 HEPES 缓冲细胞培养基（如 IMDM）稀释骨髓细胞，并在 20-25 °C下轻轻振荡 30 分钟。
2. 用 Ficoll-PaqueTM 密度梯度离心法制备单核细胞。
3. 以每 5×10^7 细胞总量 300 μ L 缓冲液的最终体积重悬细胞颗粒。如果细胞总数少于 5×10^7 ，则使用 300 μ L。进行 "磁性标记" 操作。

淋巴组织细胞的制备

1. 手术后直接将淋巴结放入装有 HEPES 缓冲培养基（如 IMDM）的 50 毫升锥形管中。
2. 将淋巴结连同培养基转移到无菌培养皿中。
3. 用两把无菌手术刀将淋巴结切成小块。将带有淋巴结小块的缓冲液转移至在无菌钢网上，钢网放置在一个新的培养皿中。
4. 用无菌注射器的活塞垂直运动，小心地将细胞推过钢网。不要磨碎细胞。
5. 使用无菌技术将过滤后的细胞悬浮液转移到新的 50 毫升锥形管中。
6. 将残留的淋巴结块放入 5-10 毫升添加了 100 U/ml DNase I 和 200 U/ml 胶原酶 IV 的 IMDM 中，37°C 孵育 30 分钟。
7. 将细胞穿过新的尼龙网筛，并将这些细胞加入之前在 50 毫升锥形管中获得的细胞悬液中。丢弃其余的淋巴结碎片。
8. 在试管中注入 IMDM，计数细胞，300 \times g 离心。

9. 完全除去上清液，将细胞颗粒重悬于缓冲液中，每 5×10^7 细胞重悬总体积为 300 μl 。如果细胞数较少，则使用 300 μl 。进行 "磁性标记" 操作。

二、磁珠标记

1. 每 5×10^7 细胞加入 100 μl FcR 阻断试剂，以阻断抗黑色素瘤磁珠的非特异性结合，混匀。最终体积为每 5×10^7 细胞 400 μl 。

2. 每 5×10^7 细胞加入 100 μl 黑色素瘤分选磁珠，混匀后在 6-12 °C 孵育 30 分钟。最终标记体积为每 5×10^7 细胞 500 μl 。

3. 加入 10-20 倍标记体积的缓冲液清洗细胞， $300 \times g$ 离心 10 分钟，去除上清液，用每 10^8 细胞 500 μl 的缓冲液重悬细胞颗粒（细胞数较少时，用 500 μl ）。继续进行 "磁性分离" 或 "磁性分离和固相细胞内染色"。

三、细胞分选

xM 或 xL 分选柱进行细胞分选

1. 选择 xM 分选柱（最多用于 2×10^8 细胞总数和最多 10^7 黑色素瘤细胞）或 xL 分选柱（最多用于 2×10^9 细胞总数和最多 10^8 黑色素瘤细胞），并将分选柱置于适当的分选器磁场中。

2. 用适量脱气缓冲液（xM: 500 μl , xL: 3 ml）清洗分选柱。

3. 将细胞通过预分离过滤器或 30 μm 尼龙网，以去除任何结块。使用前用脱气缓冲液浸湿过滤器。

4. 用适量的缓冲液将细胞悬浮液转移至分选柱中（xM: 0.5-1 毫升, xL: 1-10 毫升）。让阴性细胞通过。用适量缓冲液冲洗（xM: 3×500 μl , xL: 4×3ml）。

5. 从分选器中取出分选柱，将分选柱放在合适的收集管上，用移液管将适量的缓冲液（ xM : 1 毫升； xL : 5 毫升）移到分选柱上。使用分选柱附带的活塞，用力冲出保留的磁性细胞。
6. (可选) 为了获得更高的富集率/纯度，可重复细胞分选步骤。因此，将洗脱出的阳性细胞应用于新的预润洗的分选柱（ xM : 用于 10^7 以下的黑色素瘤细胞； xL : 用于 10^7 以上的黑色素瘤细胞），按上述方法清洗（ xM : $3 \times 500 \mu\text{l}$ ； xL : $4 \times 3\text{ml}$ ），并按上述方法使用柱塞用缓冲液洗脱保留的细胞（ xM : 500 μl ； xL : 2.5 ml）。

注意事项

- ▲ 染色过程中应避免抗体覆盖在细胞表面。快速操作，保持细胞低温，仅使用预冷溶液。
注意：在冰上操作需要延长磁珠的孵育时间。在 $6^{\circ}\text{-}12^{\circ}\text{C}$ 的冰箱中孵育。
- ▲ EDTA 可由其他补充剂代替，如酸性柠檬酸葡萄糖 (ACD-A) 或柠檬酸磷酸葡萄糖 (CPD)。可用明胶、HSA 或 FCS 等其他蛋白质代替 BSA。
- ▲ 染色和磁性标记的温度越高、孵育时间越长，可能会导致细胞非特异性标记。
- ▲ 我们强烈建议使用 FcR 阻断试剂来阻断 Fc 受体介导的非特异性标记。
- ▲ 磁珠可能会与死细胞发生非特异性结合。为去除死细胞，建议使用死细胞去除试剂盒或使用 Ficoll-PaqueTM 进行密度梯度离心。
- ▲ 将细胞加入分选柱时，起始样品中的大量细胞需要较大体积的缓冲液。每 500 μl 缓冲液中细胞的最大浓度为 10^8 个有核细胞。