

死细胞去除试剂盒(92-01-0049)

[组分]

10 mL 死细胞去除磁珠

25 mL 20× 结合缓冲液储液

[规格] 可分选 10^9 个细胞总量，多达 100 次分离。

[保存形式] 死细胞去除磁珠储存在含有稳定剂的缓冲液中。

[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]

死细胞去除磁珠能识别凋亡细胞和死亡细胞质膜上的一个分子。为了去除死细胞，对死细胞进行磁珠标记，然后通过分选柱。磁性标记的死细胞被保留在分选柱中。未标记的活细胞则通过分选柱，从而去除细胞中的死细胞。将分选柱从磁场中移除后，磁性保留的死细胞可作为正选细胞部分被洗脱出来。使用死细胞去除试剂盒，即使是细胞膜完整的早期凋亡细胞也能被去除。活化细胞，如细胞培养物中的活化细胞，也可被标记。

[试剂和仪器要求]

- 无菌双蒸水 (ddH₂O)。
- ▲ 注意：请勿使用去离子水进行稀释！
- 分选柱和分选器。

- (可选) 预分离过滤器去除细胞团块。
- (可选) 组织解离器，自动组织解离器，带有加热模块的组织解离器。
- (可选) 组织解离试剂盒。

[步骤]

一、样本准备

▲ 去除死细胞磁珠易受细菌污染。请在无菌条件下进行处理。

▲ 处理含有血小板的细胞样本（如血液样本）时，用低速离心（ $200\times g$ ）仔细清洗样本以去除血小板。这些清洗步骤应使用含有离子螯合剂 EDTA 的缓冲液。去除死细胞磁珠会与活化血小板结合。活化的血小板也会与单核细胞等白细胞结合。在这种情况下，与活化血小板结合的有活力细胞会留在磁场中，从而降低活细胞的回收率。

处理组织时，使用组织解离器和组织解离试剂盒制备单细胞悬浮液。

▲ 由于缺乏可获得的抗原，使用死细胞去除磁珠无法去除无任何质膜残留的死细胞（无细胞核的细胞器）。

二、缓冲液准备

▲ 所有洗涤和分选步骤均使用从死细胞去除试剂盒随附的 $20\times$ 结合缓冲液储液中配制的 $1\times$ 结合缓冲液。稀释 $20\times$ 结合缓冲液储液时必须使用无菌双蒸水。

▲ 注意：请勿使用去离子水稀释！

例如：用 9.5 mL 无菌双蒸水稀释 500 μL 20 \times 结合缓冲液。储存于 2-8 $^{\circ}\text{C}$ 。或者，用 475 mL 无菌双蒸水稀释 25 mL 20 \times 结合缓冲液，制备 1 \times 结合缓冲液。

▲ 注意：在无菌条件下处理！

▲ 注意：死细胞去除磁珠的结合需要 Ca^{2+} 。离子螯合剂 EDTA 的存在会破坏结合。1 \times 结合缓冲液经过优化，可实现最佳的死细胞去除磁珠结合效果。使用不同的缓冲液可能会导致死细胞去除效率降低。

三、磁珠标记

▲ 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 μm 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。

▲ 建议孵育温度为 20-25 $^{\circ}\text{C}$ 。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 $\times\text{g}$ 离心 10 分钟。去除上清。
3. 每 10^7 个细胞总量使用 100 μL 死细胞去除磁珠重悬。
4. 混匀，室温 (20-25 $^{\circ}\text{C}$) 孵育 15 分钟。
5. (可选) 必要时，在细胞悬液中加入 1 \times 结合缓冲液，使其达到 500 μL 的最小分选体积。
6. 进行细胞分选步骤。

四、细胞分选

▲ 根据总细胞数和标记细胞数选择合适的分选柱和分选器。

▲ 始终等到分选柱储液器空后再进行下一步操作。

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 1× 结合缓冲液润洗分选柱：

xM: 500 μ L

xL: 3 mL

3. 将细胞悬液转移至分选柱中。收集包含未标记细胞的流出液。

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 1× 结合缓冲液，待液体全部流尽，再加入适量缓冲液，一共洗 4 次。收集总流出物，和第 3 步的流出液混合在一起。

xM: 4×500 μ L

xL: 4×3 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

7. (可选)为了提高死细胞去除的效率，活细胞部分可以在第二个 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。

8. 使用膜非透性染料（如台盼蓝）对死亡细胞进行显微分析，或使用碘化丙啶溶液或 7-AAD 染色溶液进行流式细胞分析。