

CD14分选磁珠，人，冻干粉(92-01-0140)

[组分]

1 瓶 人冻干 CD14 磁珠：与抗人 CD14 单克隆抗体（同种型：小鼠 IgG2a）偶联的磁珠。

2 mL 复原缓冲液。

[规格] 可分选 10^9 个细胞总量。

[保存形式] 冻干粉。复原缓冲液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 CD14 磁珠对 CD14+ 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 CD14+ 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 CD14+ 细胞可作为正选细胞部分被洗脱出来。

[背景信息]

CD14 磁珠可用于从脐带血或 PBMC 以及胸膜，腹膜或滑液或来自各种组织（例如脾和淋巴结）的人单核细胞和巨噬细胞的阳性选择或去除。CD14 抗原属于 LPS 受体复合物。抗体与 CD14 的结合不会触发信号转导，因为 CD14 缺乏细胞质结构域。CD14 在大多数单核细胞和巨噬细胞上强烈表达，在中性粒细胞和一些骨髓树突细胞上表达较弱。

[试剂和仪器要求]

- 缓冲液： 配制含有 pH7.2 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,例如人血清白蛋白、人血清或胎牛血清。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： CD14 阳性细胞可以用 xM、xL 分选柱富集。强烈表达 CD14 抗原的细胞也可以用 xM、xL 分选柱去除。
- (可选) 荧光偶联的 CD14 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) 死细胞清除试剂盒用于死细胞的清除。
- (可选) 预分离过滤器去除细胞团块。

[步骤]

一、磁珠溶解

向小瓶中加入所有复原缓冲液，溶解冻干磁珠。用移液管吹吸混合，直至重新悬浮。溶解后的磁珠在 2-8 °C 下可稳定保存 9 个月。在小瓶标签上写上溶解后的新有效期。

二、样本准备

在处理抗凝外周血或白膜层时，应使用密度梯度离心法分离外周血单个核细胞（PBMC）。

▲注:在密度梯度分离后除去血小板,将细胞重悬于缓冲液中,在 $200\times g$ 下 20°C 离心 10-15 分钟。

小心抽吸上清。重复洗涤步骤。

当处理组织或溶血时,使用标准方法制备单细胞悬浮液。

▲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。

三、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。

▲ 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 10^7 个细胞总量使用 $80\ \mu\text{L}$ 缓冲液重悬。

4. 每 10^7 个细胞总量添加 $20\ \mu\text{L}$ CD14 磁珠。

5. 混匀, $2-8^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 分钟。

6. (可选) 添加染色抗体,例如: $10\ \mu\text{L}$ CD14-FITC $2-8^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 5 分钟。

7. 每 10^7 个细胞加入 1-2 mL 缓冲液洗涤细胞， $300\times g$ 离心 10 分钟，去上清。

8. 用 500 μL 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。

四、细胞分选

▲ 根据总细胞数和 CD14+ 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排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. 用适当体积的缓冲液润洗分选柱：

xM: 500 μL

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，和第 3 步的流出液混合。

xM: $3\times 500\ \mu\text{L}$

xL: $3\times 3\ \text{mL}$

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 CD14+ 细胞的纯度，洗脱的部分可以在第二个 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。