



浆细胞样树突状细胞分选试剂盒II，人(92-01-0280)

[组分]

2 mL 人非 PDC 生物素抗体混合物 II：结合生物素的单克隆抗体的混合物，抗浆细胞样树突状细胞不表达的抗原。

2 mL 人非 PDC 磁珠混合物 II：与浆细胞样树突状细胞不表达的抗原对应抗体偶联的磁珠和与单克隆抗生物素抗体（同种型：小鼠 IgG1）偶联的磁珠组成的混合物。

[规格] 可分选 2×10^9 个细胞总量，多达 20 次分离。

[保存形式] 所有组分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]

使用浆细胞样树突状细胞分选试剂盒 II，可以通过去除非目标细胞来分离人浆细胞样树突状细胞（PDC）。用生物素结合的单克隆抗体混合物（作为一级标记试剂）和与磁珠结合的抗生物素单克隆抗体（作为二级标记试剂）对非目标细胞进行间接磁性标记。此外，非 PDC 可直接用针对 PDC 上不表达的抗原对应的抗体偶联的磁珠混合物进行磁性标记。磁性标记的非目标细胞在分选器的磁场中保留在分选柱中，而未标记的 PDC 则通过分选柱流出。

[背景信息]

PDC 是最初在人类外周血中发现的树突状细胞的三个亚群之一。它们也被称为浆细胞 T 细胞、浆细胞单核细胞、淋巴树突状细胞、IFN α / β 产生细胞 (IPCs) 或 2 型前树突状细胞 (pDC2)。在病毒感染时,它们会产生大量 I 型干扰素,从而阻止病毒复制并刺激先天性和适应性免疫反应。在培养过程中,PDCs 单独或与适当的刺激物结合暴露于 IL-3 后,会成熟为强大的抗原递呈细胞。在健康捐献者中,PDC 约占外周血单核细胞 (PBMC) 总数的 0.4%。除血液外,在人体淋巴组织和炎症部位,如系统性红斑狼疮 (SLE) 或寻常型银屑病患者皮肤中也发现了未成熟的 PDCs。在血液和骨髓中,PDCs 被鉴定为 CD303 (BDCA-2)+、CD304 (BDCA-4/Neuropilin-1)+、CD123+、CD11c-。与 CD123 不同,CD303 (BDCA-2) 和 CD304 (BDCA-4/Neuropilin-1) 只在 PDCs 上表达。此外,它们是 CD4+、CD45RA+、CD141 (BDCA-3)^{dim}、CD1c (BDCA-1)-、CD2-,缺乏谱系标志物 (CD3、CD14、CD16、CD19、CD20、CD56) 的表达,既不表达髓样标志物,如 CD13 和 CD33,也不表达 Fc 受体,如 CD16、CD64 或 Fc γ RI。

[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,例如人血清白蛋白、人血清或胎牛血清。不建议使用含有 Ca²⁺ 或 Mg²⁺ 的缓冲液或培养基。
- 分选柱和分选器。
- (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) 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、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。

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 10^8 个细胞总量。当处理少于 10^8 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 2×10^8 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 $30\text{ }\mu\text{m}$ 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×g 离心 10 分钟。去除上清。
3. 每 10^8 个细胞总量使用 400 μ L 缓冲液重悬。
4. 每 10^8 总细胞加入 100 μ L 非 PDC 生物素抗体混合物 II。
5. 混合均匀，在冰箱(2 - 8°C)中孵育 10 分钟。
6. 每 10^8 细胞加入 5 - 10 mL 缓冲液洗涤细胞，并在 300×g 离心 10 分钟。完全去除上清。
7. 每 10^8 个细胞加入 400 μ L 缓冲液。
8. 每 10^8 细胞加入 100 μ L 非 PDC 磁珠混合物 II。
9. 混合均匀，在冰箱(2 - 8°C)中再孵育 15 分钟。
10. 每 10^8 个细胞加入 5 - 10 mL 缓冲液洗涤细胞，300×g 离心 10 分钟，去上清。
11. 用 500 μ 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。

12. 进行细胞分选步骤。

三、细胞分选

▲ 根据总细胞数和 PDC 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。

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，这是富集的 PDC 细胞。
4. 加 3 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 3 次。收集总流出物，这是 PDC 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。加入 5 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非 PDC 细胞。