

树突细胞分选试剂盒II，人（血液样本）（92-01-0281）

[组分]

2 mL 非 DC 去除混合物，人：由抗人 CD1c (BDCA-1) (克隆：AD5-8E7；同种型：小鼠 IgG2a) 的单克隆生物素抗体，以及抗人 CD14 (同种型：小鼠 IgG2a) 和人 CD19 (同种型：小鼠 IgG1) 的单克隆抗体结合的磁珠组成的混合物。

2 mL 人 DC 富集混合物：与针对人 CD304 (BDCA-4/神经纤蛋白-1) (同种型：小鼠 IgG1)、人 CD141 (BDCA-3) (同种型：小鼠 IgG1) 和生物素 (同种型：小鼠 IgG1) 的单克隆抗体偶联的磁珠。

2 mL FcR 阻断试剂：人 IgG。

[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]

血液树突状细胞分选试剂盒 II 用于从外周血单个核细胞 (PBMC) 中分离树突状细胞。树突状细胞的分选分两步进行。首先，用非 DC 去除混合物对 PBMC 进行标记，混合物由 CD14 和 CD19 磁珠组成，用于对单核细胞和 B 细胞进行磁性标记；CD1c (BDCA-1) 生物素结合抗体用于对 CD1c (BDCA-1)+ 髓样树突状细胞进行生物素标记。随后将细胞放在分选柱上进行磁性分离，磁性标记的单核细胞和 B 细胞被清除。然后将含有预富集树突状细胞的流过部分与 DC 富集混合物一起孵育，其中包括 CD304 (BDCA-4/Neuropilin-1) 和 CD141 (BDCA-3) 磁珠，用于磁性标记浆细胞树突状

细胞和 CD141 (BDCA-3) + 髓样树突状细胞；以及抗生物素磁珠，用于磁性标记上一步中生物素标记的 CD1c (BDCA-1) + 髓样树突状细胞。在随后的磁性分离过程中，磁性标记的树突状细胞被保留在分选柱上，并在分选柱脱离磁场后被洗脱。为了达到最高纯度，含有富集树突状细胞的正选细胞部分会在第二个分选柱上分离。

[背景信息]

树突状细胞是最有效的抗原递呈细胞，在启动和引导免疫反应方面发挥着关键作用。在血液中，至少有三个不同的亚群：浆细胞树突状细胞 (PDCs) 和两个不同的髓样树突状细胞亚群 (MDC1s 和 MDC2s)。这些亚群在表型和功能上存在差异。血液树突状细胞分选试剂盒 II 可同时分离 PDCs、MDC1s 和 MDC2s。所有树突状细胞亚群的免疫磁标记均使用三种标记物：CD304 (BDCA-4/Neuropilin-1)、CD1c (BDCA-1) 和 CD141 (BDCA-3)。CD304 (BDCA-4/Neuropilin-1) 的表达严格局限于 PDCs。CD1c (BDCA-1) 在 CD11^{high} CD123^{low} 的 MDC1 上表达。CD141 (BDCA-3) 仅在 MDC2 上高水平表达，MDC2 为 CD11c^{low} 和 CD123⁻。在血液中，CD1c (BDCA-1) 也在 B 细胞上表达，CD141 (BDCA-3) 也在单核细胞上低水平表达。因此，在通过磁性标记 CD304 (BDCA-4)、CD1c (BDCA-1) 和 CD141 (BDCA-3) 正向选择浆细胞和髓样树突状细胞之前，要先清除单核细胞和 B 细胞。

在健康供体中，树突状细胞约占所有 PBMC 的 1%，其中约 0.37% 为 PDC，0.60% 为 MDC1，0.03% 为 MDC2。

[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 Ca^{2+} 或 Mg^{2+} 的缓冲液或培养基。
- 分选柱和分选器。
- （可选）血液树突状细胞计数试剂盒用于评估树突状细胞纯度和鉴定不同的树突状细胞亚群。要确定树突状细胞的纯度，可使用荧光染料结合抗体的混合物，如 CD14-FITC、CD19-FITC、CD1c（BDCA-1）-PE、CD303（BDCA-2）-PE 和 CD141（BDCA-3）-PE。
- （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、磁珠标记非 DC 细胞

▲ 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 $30\ \mu\text{m}$ 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 10^8 个细胞总量使用 $300\ \mu\text{L}$ 缓冲液重悬。

4. 每 10^8 细胞加入 $100\ \mu\text{L}$ FcR 阻断试剂和 $100\ \mu\text{L}$ 非 DC 去除混合液。

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

6. 每 10^8 个细胞加入 5 - 10 mL 缓冲液洗涤细胞， $300 \times g$ 离心 10 分钟，去上清。

7. 用适量缓冲液重悬细胞：

用 LD 柱去除： $500\ \mu\text{L}$ 最多可重悬 1.25×10^8 个细胞。

8. 进行细胞分选步骤。

三、细胞分选：非 DC 细胞的去除

使用 LD 柱去除

1. 将 LD 柱置于合适的分选器磁场中。
2. 用 2mL 缓冲液冲洗制备分选柱。
3. 将细胞悬浮液装载到分选柱上。
4. 收集通过的未标记细胞，用 2×1 mL 缓冲液洗涤柱。收集全部流出液，这是未标记的预富集树突状细胞片段。通过添加两次缓冲液来执行洗涤步骤。只有在储液管排空时才添加新的缓冲液。
5. 继续分离树突状细胞。

四、预富集 DC 细胞的磁珠标记

▲ 下面给出的磁性标记体积适用于最多 10^8 个细胞的初始细胞数（步骤二）。如果起始细胞数较多，可相应增加试剂体积。

▲ 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. 将细胞悬浮液在 $300 \times g$ 转速下离心 10 分钟。完全去除上清液。
2. 用 400 μ L 缓冲液重悬细胞颗粒。
3. 加入 100 μ L DC 富集混合物。
4. 混匀并在冰箱中培养 15 分钟（2-8 $^{\circ}$ C）。
5. 加入 5-10 mL 缓冲液清洗细胞， $300 \times g$ 离心 10 分钟。完全去除上清液。
6. 用 500 μ L 缓冲液重悬 10^8 个细胞。



7. 进行细胞分选。

五、细胞分选：DC 细胞的阳性分选

xM 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 500 μL 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。
4. 加 500 μL 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，和第三步流出物混合。
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. 加入 500 μL 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。
7. 为了提高 DC 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。