

Pan DC分选磁珠，小鼠(92-01-0284)

[组分]

小鼠 Pan DC 磁珠：与抗小鼠 CD11c (REA754) 单克隆抗体 (同型：人 IgG1) 和抗 mPDCA-1 抗体 (同型：大鼠 IgG1) 偶联的磁珠。

[规格] 2 mL，可分选 2×10^9 个细胞总量。

[保存形式] DC 磁珠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]

首先，用 DC 磁珠对 DC+ 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 DC+ 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 DC+ 细胞可作为正选细胞部分被洗脱出来。

[背景信息]

Pan DC 分选磁珠由 CD11c 和 抗 mPDCA-1 磁珠组成。CD11c 在典型 DC 上高水平表达，在浆细胞状树突状细胞 (PDC) 上中低水平表达。小鼠浆细胞树突状细胞抗原-1 (mPDCA-1) 特异性地表达于淋巴和非淋巴器官中表型为 CD11c^{low}、CD45R(B220)+ 和 Ly-6C+ 的 PDCs 上。由于 CD11c 在 PDCs 上的表达量较低，使用 CD11c 表达可能无法像典型 DCs 那样富集 PDCs。因此，我们开发了 Pan DC 分选磁珠，以最高的回收率同时分离典型 DC 和浆细胞 DC 亚群。

[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,例如小鼠血清白蛋白、小鼠血清或胎牛血清。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。
- 胶原蛋白酶 D: 2 mg/mL (胶原蛋白酶 D >0.15 U/mg, 如德国罗氏诊断公司), 10 mM HEPES-NaOH, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 1.8 mM CaCl_2 。
- (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) FcR 阻断试剂。
- (可选) 预分离过滤器去除细胞团块。

[步骤]

一、样本准备

- ▲ 要从小鼠脾脏中获得最高回收率和纯度的总 DCs, 必须用胶原酶 D 酶解制备单细胞悬浮液。
- ▲ 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。

1. 将分离的脾脏放入 6 厘米的培养皿中，加入足够的胶原酶 D 溶液以完全覆盖培养皿底部（5 毫升/脾脏）。
2. 用 1mL 注射器和 25G 针头为每个小鼠脾脏注射 500 μ L 胶原酶 D 溶液，然后用锋利的剪刀将组织剪成小块。
3. 将脾块放入胶原酶 D 溶液中，在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 30 分钟。
4. 用活塞将整个材料，即剩余的碎片和释放胶原酶 D 的细胞，轻轻通过 70 μ m 的细胞过滤器。
5. 将所有细胞收集到 15 mL 试管中，加入缓冲液清洗细胞，最终体积为 14 mL。
6. 进行磁性标记。

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 μ 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 400 μ L 缓冲液重悬。

▲注：为获得高纯度的 DCs ($\geq 90\%$)，在加入 Pan DC 分选磁珠之前，应在细胞悬浮液中加入 FcR 阻断试剂或小鼠免疫球蛋白（每 500 μL 标记体积 1 毫克）来阻断 Fc 受体介导的磁性标记。

4. 每 10^8 个细胞总量添加 100 μL Pan DC 磁珠。
5. 混匀，2-8 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 分钟。
6. (可选) 添加染色抗体，根据说明书推荐。
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。

三、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。收集流出的未标记细胞。
4. 加适量缓冲液洗脱，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。

xM: 3 \times 500 μL xL: 3 \times 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 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。