

PanDC分选试剂盒，小鼠(92-01-0285)

[组分]

2 mL 小鼠 Pan 树突状细胞生物素抗体混合物：针对树突状细胞不表达的抗原的单克隆抗体偶联生物素混合物。

2×2 mL 抗生物素磁珠：与单克隆抗生物素抗体（同型：小鼠 IgG1）偶联的磁珠。

1 mL 小鼠 FcR 阻断剂

[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 Pan 树突状细胞分选试剂盒，通过去除非目标细胞（阴性选择）来分离小鼠经典树突状细胞（DC）和浆细胞树突状细胞（PDC）。用生物素结合的单克隆抗体混合物（作为一级标记试剂）和抗生物素磁珠（作为二级标记试剂）对非目的细胞进行间接磁性标记。在分选器的磁场中，磁性标记的非目的细胞被保留在分选柱中，而未标记的树突状细胞则通过分选柱。

[背景信息]

树突状细胞（DC）是最有效的抗原递呈细胞，在启动和引导免疫反应中发挥着关键作用。在脾脏中，有四个主要亚群，一般可分为产生 IFN- α 的浆细胞 DC（以表达

CD11b-Ly-6C+B220+mPDCA-1+Siglec-H+ 为特征) 和三个经典 DC 亚群 (CD11b+CD4+CD8-、CD11b+CD4-CD8- 和 CD11b-CD8+CD4-)。此外, 所有 DC 通常都以表达 DC 标记 CD11c 为特征。

[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: 非 DC 细胞的去除使用 xL 分选柱。
- 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) 组织解离器和自动组织解离器。
- (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

要从小鼠脾脏中获得最高纯度的总 DCs，必须使用胶原酶 D 进行酶解，制备单细胞悬浮液。

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。

▲ 注：死细胞可能与磁珠非特异性结合。如果死细胞数量较多，建议通过密度梯度离心或使用死细胞去除试剂盒去除死细胞。

6. 进行磁性标记。

▲ 另外，也可使用组织解离器来离解小鼠脾脏。

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 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。

▲ 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 350 μL 缓冲液重悬。

4. 每 10^8 细胞加入 50 μL FcR 阻断试剂。

5. 每 10^8 个细胞加入 100 μL Pan 树突状细胞生物素抗体混合物。最终标记体积为每 10^8 细胞 500 μL 。

6. 混匀，并在冰箱 (2-8 $^{\circ}\text{C}$) 中孵育 10 分钟。

7. 每 10^8 个细胞加入 5-10 mL 缓冲液清洗细胞，然后 300 \times g 离心 10 分钟。完全去除上清液。

8. 用 800 μL 缓冲液重悬细胞颗粒。

9. 每 10^8 个细胞总量添加 200 μL 抗生物素磁珠。

10. 混匀，2-8 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 分钟。

11. 进行细胞分选步骤。

三、细胞分选

▲ 根据总细胞数和标记的细胞数选择合适的分选柱和分选器。

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，这是富集的树突状细胞。
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 2 次。收集总流出物，这是树突状细胞，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。加入适量缓冲液到分选柱中，迅速用塞子推下，得到就是非树突状细胞。