

抗 F4/80 超纯分选磁珠，小鼠(92-01-0176)

[组分]

抗 F4/80 超纯磁珠，小鼠：与单克隆抗小鼠 F4/80 抗体偶联的磁珠（同种型：人 IgG1）。

[规格] 2 mL，可分选 2×10^9 个细胞总量，多达 200 次分离。

[保存形式] 抗 F4/80 超纯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，F4/80 超纯磁珠 对 F4/80+ 细胞进行磁性标记。然后，将细胞悬浮液装入分选柱，该分选柱置于分选器的磁场中。磁性标记的 F4/80+ 细胞被保留在柱内，未标记的细胞则流出。将分选柱从磁场中移出后，磁性保留的 F4/80+ 细胞可作为正选细胞部分被洗脱出来。为了提高纯度，必须通过第二根柱分离包含 F4/80+ 细胞的阳选部分。

[背景信息]

F4 / 80 是表皮生长因子（EGF）跨膜 7（TM7）家族的成员，由一个跨度为 7 个跨膜的分子组成，具有一个大的细胞外多个包含 EGF 模块的结构域。F4 / 80 被认为是鼠巨噬细胞最特异的细胞表面标记之一。在大多数长存的组织巨噬细胞中发现 F4 / 80 的组成型和高表达，包括脾脏，大脑中的小胶质细胞，肝脏中的 Kupffer 细胞和皮肤中的 Langerhans 细胞。另外，还可以根据细胞的生理状态来调节 F4 / 80 的表达。

抗 F4 / 80 超纯化磁珠经过优化，可从淋巴和非淋巴组织的单细胞悬液中快速，简单地分离小鼠巨噬细胞。超纯化磁珠通过特异性富集活细胞，大大提高了分选细胞的回收率和纯度。

[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。
- 分选柱和分选器： F4/80 阳性细胞可以用 xM、xL 分选柱富集。
- (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

在处理淋巴器官或肺淋巴组织时，应使用手动方法或者组织解离器制备单细胞悬浮液。

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 10^7 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 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 10^7 个细胞总量使用 90 μL 缓冲液重悬。

4. 每 10^7 个细胞总量加入 10 μL 抗 F4/80 超纯磁珠。

5. 混匀，2–8 $^{\circ}\text{C}$ 下避光孵育 15 分钟。

6. 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。

7. 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。

8. 进行细胞分选步骤。

三、细胞分选

▲ 根据总细胞数和 F4/80+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 μ L

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 μ L

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，得到就是标记的细胞。

xM: 1 mL

xL: 5 mL

7. 为了提高 F4/80+细胞的纯度，洗脱的部分必须在第二个 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。