

髓系树突细胞分选试剂盒，人(92-01-0278)

[组分]

2 mL 非骨髓树突状细胞生物素抗体混合物，人：生物素偶联的单克隆抗人抗体混合物，针对骨髓树突状细胞不表达的抗原。

2mL 抗生物素磁珠：与抗生物素单克隆抗体（同种型：小鼠 IgG1）偶联的磁珠。

2mL FcR 封闭试剂，人：同种型：人 IgG 。

[规格] 可分选最多 2×10^9 个细胞总数，多达 20 次分选。

[保存形式] 所有组分均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，请勿冻存。有效期见试剂外标签。

[分选原理]

骨髓树突状细胞分选试剂盒专为从外周血单个核细胞（PBMC）中同时分离 CD1c (BDCA-1)+ 和 CD141 (BDCA-3/血栓调节蛋白)+ 树突状细胞而开发。使用骨髓树突状细胞分选试剂盒去除非 MDC（阴性选择）来分选人骨髓树突状细胞（MDC）。非 MDC 使用生物素偶联的单克隆抗体混合物作为主要标记试剂，以及与磁珠偶联的抗生物素单克隆抗体作为辅助标记试剂进行间接磁性标记。通过将这些细胞保留在分选柱上（置于分选器的磁场中），磁性标记的非 MDC 就会被去除。未标记的 MDC 通过分选柱流出。

[背景信息]

树突状细胞 (DC) 是主要的抗原呈递细胞，能够启动初级免疫反应。人类 DC 细胞大致可分为髓样 DC 和浆细胞样 DC。髓系树突状细胞 (MDC) 的两个亚群已分别根据 CD1c (BDCA-1) 和 CD141 (BDCA-3) 的表达进行了表征。CD1c (BDCA-1)+ MDC 为 CD11 高表达、CD32+、CD64+、FcεR1+和 CD123 低表达，在外周血中的平均频率为 0.6%。

一些 CD1c (BDCA-1)+ MDC 表达 CD14 和 CD11b。CD1c (BDCA-1) 也在一小部分静息 B 细胞上表达。

CD141 (BDCA-3/血栓调节蛋白) 高表达 MDC 是外周血中频率约为 0.04% 的一个小亚群。CD141 (BDCA-3) 高表达的 MDC 有 CD11c^{dim}、CD123⁻ 和 CD4⁺。CD141 (BDCA-3) 抗原在 CD1c (BDCA-1)+ MDC、浆细胞样 DC、单核细胞和粒细胞的表达水平也较低。

[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 2mMEDTA 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：使用 LD 分选柱去除非 MDC 细胞。
- (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

当处理抗凝外周血或白膜层时，应通过密度梯度离心法分离外周血单个核细胞(PBMC)。

▲注意：在密度梯度分离后取出血小板，请将细胞颗粒重新悬浮在缓冲液中，并在 20°C 下以 $200\times g$ 的速度离心 10—15 分钟。仔细吸去上清，重复洗涤步骤。

▲死细胞可能与磁珠非特异性结合。要去除死细胞，我们建议使用密度梯度离心法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 的细胞数量时，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， 2×10^8 个总细胞，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 $30\mu m$ 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 $300\mu L$ 缓冲液重悬。
4. 加入 $100\mu L$ FcR 封闭试剂。
5. 每 10^8 个细胞总量添加 $100\mu L$ 非髓系树突细胞生物素抗体混合物。
6. 充分混匀，2–8 °C 孵育 10 分钟。

7. 每 10^8 个细胞添加 5-10mL 缓冲液洗涤细胞，并以 $300\times g$ 离心 10 分钟。完全吸出上清液。
8. 重复步骤 7。
9. 每 10^8 个细胞总量使用 400 μ L 缓冲液重悬。
10. 每 10^8 个细胞总量加入 100 μ L 抗生物素磁珠。
11. 充分混匀，2-8 $^{\circ}$ C 孵育 15 分钟。
12. 每 10^8 个细胞添加 5-10mL 缓冲液洗涤细胞，并以 $300\times g$ 离心 10 分钟。完全吸出上清液。
13. 以每 10^8 个总细胞用 500 μ L 缓冲液重悬。
14. 进行细胞分选。

三、细胞分选

使用分选 LD 柱进行分选

1. 将 LD 分选柱置于合适的分选器中。
2. 用 2mL 缓冲液润洗分选柱。
3. 将细胞悬液转移至分选柱中。
4. 结合磁珠的细胞会被吸附到分选柱上，没有结合的细胞会顺着液体流下来。加 1mL 缓冲液，待液体全部流尽，再加入 1mL 缓冲液。收集总流出物，这是未标记的髓系树突细胞。