

记忆B细胞分选试剂盒，人(92-01-0331)

[组分]

2 mL B 细胞生物素抗体混合物，人：抗 CD2、CD14、CD16、CD36、CD43 和 CD235a（糖蛋白 A）的单克隆小鼠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偶联的磁珠（同种型：小鼠 IgG1）。

2 mL CD27 磁珠：与单克隆抗人 CD27 抗体偶联的磁珠（同种型：小鼠 IgG1）。

[规格] 可分选 2×10^9 个细胞总量。

[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]

记忆 B 细胞的分选分为两步进行。首先用生物素抗体混合物作为一级标记试剂与磁珠偶联的抗生物素单克隆抗体作为二级标记试剂进行间接性磁标记非 B 细胞。在两个标记步骤之间不需要洗涤步骤。

随后，将磁性标记的非 B 细胞留在分选柱内，而未标记的 B 细胞则穿过分选柱流出。

第二步，直接用 CD27 磁珠标记记忆 B 细胞，并通过正选从预富集的记忆 B 细胞中分离出来，将分选柱从分选器中取出后，磁性标记的记忆 B 细胞可以作为正选细胞部分被洗脱。

[背景信息]

记忆 B 细胞分选试剂盒专为从人外周血单核细胞（PBMC）中分离记忆 B 细胞而开发。记忆 B 细胞被定义为经历过抗原的静态 B 细胞，是响应 T 细胞依赖性和 T 细胞非依赖性抗原而产生的。它们

能够对反复出现的抗原挑战快速做出反应，从而提供血清学免疫保护。

CD27 是 TNF 受体家族的成员，在大多数记忆 B 细胞上表达。可以把它们与原始 B 细胞 (CD27-) 区分开来。通过去除不需要的非 B 细胞并随后使用 CD27 微珠进行正选来分离记忆 B 细胞。使用针对 CD2、CD14、CD16、CD36、CD43 和 CD235a (糖蛋白 A) 的生物素化抗体混合物来消除不需要的细胞，例如 T 细胞、NK 细胞、单核细胞、树突状细胞、粒细胞、血小板和红细胞和抗生物素磁珠。

为了评估磁分选效果，建议使用 CD19-APC 和 CD27-PE 抗体进行染色。请勿使用克隆号 M-T271 进行 CD27 染色。

[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。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：可以在 LD 柱上去除非 B 细胞。随后可以在 xM 柱上对记忆 B 细胞进行正选。
- (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) 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×g 的速度离心 10—15 分钟。仔细吸去上清，重复洗涤步骤。

在处理组织或溶解的血液时，使用标准方法制备单细胞悬液。

▲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（2-8°C），将防止细胞表面的非特异性标记。

▲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×g 离心 10 分钟。去除上清液。
3. 每 10^8 个细胞总量使用 400 μ L 缓冲液重悬。

4. 每 10^8 个细胞总量添加 100 μL B 细胞生物素抗体混合物。
5. 充分混匀，2-8 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 分钟。
6. 每 10^8 个细胞总量添加 300 μL 缓冲液，每 10^8 个细胞加入 200 μL 抗生物素磁珠。
7. 充分混匀，2-8 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 分钟。
8. 每 10^8 个细胞添加 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。
9. 用 1mL 缓冲液重悬最多 10^8 个细胞。
10. 进行细胞分选。

三、细胞分选

▲ 根据总细胞数和记忆 B 细胞数选择合适的分选柱和分选器。

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，这是未标记的预富集记忆 B 细胞。
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。将 3mL 缓冲液加入分选柱，将柱塞用力推下，立即冲洗出磁性标记的非 B 细胞。

四、磁性标记：记忆 B 细胞

下面给出的磁珠标记规模为 10^8 个细胞总量。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。

1. $300\times g$ 离心 10 分钟。去除上清。
2. 每 10^8 个细胞总量使用 100 μL 缓冲液重悬。
3. 每 10^8 个细胞总量添加 100 μL CD27 磁珠。
4. 混匀，2–8 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 分钟。
5. 每 10^8 个细胞加入 10 mL 缓冲液洗涤细胞， $300\times g$ 离心 10 分钟，去上清。
6. 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。

7. 进行细胞分选步骤。

五、细胞分选：记忆 B 细胞

1. 将 xM 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。
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。加入 500 μL 的缓冲液，待液体全部流尽，再加入 500 μL 缓冲液，一共洗 3 次。收集总流出物，这是未标记的细胞。
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 1 mL 的缓冲液到分选柱中，迅速用塞子推下，得到就是记忆 B 细胞。