

浆细胞分选试剂盒II，人(92-01-0332)

[组分]

2 mL 非浆细胞生物素抗体混合物，人：抗 CD2、CD3、CD10、CD13、CD15、CD22、CD34、CD123 和 CD235a（糖蛋白 A）单克隆抗体偶联生物素混合物。

2×2 mL 非浆细胞磁珠混合物，人：CD14 磁珠与生物素抗体磁珠的混合物。

2 mL CD56 磁珠：与单克隆抗人 CD56 抗体偶联的磁珠。（同种型：小鼠 IgG1）

1 mL CD38 磁珠：与单克隆抗人 CD38 抗体偶联的磁珠。（同种型：小鼠 IgG2a）

[规格] 可分选 2×10^9 个细胞总量，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]

浆细胞分离试剂盒 II 专为通过执行两个磁力分选步骤从外周血单个核细胞（PBMC）和骨髓中分离 CD38+ 浆细胞而开发。首先，第一步用生物素偶联单克隆抗体混合物和抗生物素磁珠混合物间接磁性标记非浆细胞。随后通过分选柱分离来去除标记的细胞。第二步，直接用 CD38 磁珠标记 CD38+ 浆细胞，并通过正选从预富集的浆细胞组分中分离出来。将分选柱从磁场中移开后，磁性保留的 CD38+ 浆细胞可以作为正选细胞部分洗脱。

[背景信息]

人浆细胞是异源细胞群，包括来自淋巴组织中的短寿命和增殖性浆母细胞的几个亚组，外周血中的过渡浆细胞至骨髓中的长寿和非分裂浆细胞。通过高水平 CD38 抗原的表达可鉴定所有分化阶段的浆细胞。然而，其他表面标志物根据分化阶段和空间定位而差异表达。血液循环中的浆细胞缺乏典型 B 细胞标记物 CD22 的表达，并且发现其表达的 CD19 水平低于成熟 B 细胞。它们进一步表达为 CD27 +，CD31 +，CD44 +，CD45 +，CD56-，CD62L +，CD86 + 和 HLA-DR +。CD38 + 血浆细胞的亚群进一步表达 CD138 抗原，而所有 CD38 + 浆细胞也是骨髓中的 CD138 +。为了从骨髓中分离出恶性浆细胞，可以不加 CD56 磁珠，以避免去除表达 CD56 的肿瘤细胞。

[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：非浆细胞的去除是在 LD 柱上进行的。随后在两个 xM 柱上进行 CD38+浆细胞的阳性选择。
- （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。当处理更多或者更少（至少 10^7 总细胞）的细胞时，相应地扩大或缩小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 非浆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 200 μL 缓冲液。
7. 每 10^8 个细胞加入 200 μL 非浆细胞磁珠混合物。
8. 每 10^8 个细胞添加 100 μL CD56 磁珠。
9. 充分混匀，2-8 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 分钟。
10. 每 10^8 个细胞添加 5-10 mL 缓冲液洗涤细胞，并以 $300 \times g$ 离心 10 分钟。完全吸出上清液。
11. 用 500 μL 缓冲液重悬最多 1.25×10^8 个细胞。

▲ 注：细胞数量增多需相应地增加缓冲液的体积。

12. 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 2 mL 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 1 mL 缓冲液，待液体全部流尽，再加入 1 mL 缓冲液。收集总流出物，这是未标记的预富集 CD38⁺浆细胞。
5. 继续标记 CD38⁺浆细胞。

四、磁性标记：CD38+浆细胞

下面给出的磁珠标记规模最多为 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)。

▲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. $300 \times g$ 离心 10 分钟。去除上清。
2. 使用 50 μ L 缓冲液重悬。
3. 添加 50 μ L CD38 磁珠。
4. 混匀，2–8 °C 孵育 15 分钟。
5. (可选) 添加染色抗体，例如 10 μ L CD38-FITC、CD19-APC 或 CD138-PE，并在冰箱 (2–8 °C) 中避光孵育 5 分钟。
6. 添加 5–10 mL 缓冲液洗涤细胞， $300 \times g$ 离心 10 分钟，去上清。
7. 用 500 μ L 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。

五、细胞分选：CD38+浆细胞

1. 将 xM 分选柱置于相对应的分选器中。
2. 用 500 μ L 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 μ L 的缓冲液,

待液体全部流尽,再加入 500 μ L 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。

▲ 注意:若要进行第二次分选,可直接将细胞从第一个分选柱洗脱到第二个分选柱中,不需要使用收集管。

6. 加 1mL 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 CD38⁺细胞。

7. 为了提高 CD38⁺细胞的纯度,洗脱的部分可以在第二个 xM 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。