

抗鼠 IgG分选磁珠(92-01-0027)

[组分]

1 mL 抗小鼠 IgG 磁珠：与山羊抗小鼠 IgG (H+L) F(ab')₂ 片段（人血清吸收）共轭的磁珠。

[规格] 可分选 5×10^8 个细胞总量，多达 50 次分选。

[保存形式] 抗小鼠 IgG 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，请勿冻存。有效期见试剂外标签。

[原理]

首先，用小鼠 IgG 一抗标记细胞。然后，用抗小鼠 IgG 磁珠对细胞进行磁珠标记。然后，将细胞悬浮液装入分选柱，再将其置于分选器的磁场中。磁性标记的细胞被保留在柱内，未标记的细胞则流过。将分选柱从磁场中移出后，磁性保留的细胞可作为正选细胞部分被洗脱出来。

[背景]

抗小鼠 IgG 磁珠是为阳选或去除用小鼠 IgG 一抗标记的细胞而开发的。它们还可用于阳选或去除用小鼠 IgG 一抗标记的亚细胞物质、细菌或其他微生物。

抗小鼠 IgG 磁珠可与小鼠 IgG 分子的重链和轻链结合。此外，它们还能与其他小鼠免疫球蛋白类（如 IgM 和 IgA）的轻链发生反应。

[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。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。

● 分选柱和分离器。

● 小鼠 IgG 同型的一抗。

▲ 注： 也可使用培养上清或抗血清代替纯化抗体作为主要标记试剂。使用抗血清时，我们建议在不表达抗原的细胞上对抗血清进行再吸附，或通过亲和层析、硫酸铵沉淀、离子交换层析等方法纯化抗血清，以去除非特异性交叉反应。

▲ 注： 使用荧光标记一抗时，建议使用抗荧光素磁珠。

● (可选) 针对一抗的荧光共轭抗体。

● (可选) 碘化丙啶溶液或 7-AAD，用于流式细胞仪排除死细胞。

● (可选) 用于清除死细胞的死细胞清除试剂盒。

● (可选) 预分离过滤器去除细胞团块。

[步骤]

一、样本准备

在处理抗凝外周血或白膜层时，应使用密度梯度离心法分离外周血单核细胞（PBMC），例如使用 Ficoll-Paque™ 方法。

▲注：密度梯度分离后除去血小板，将细胞重悬于缓冲液中，在 200×g 下 20°C 离心 10-15 分钟。小心抽吸上清。重复洗涤步骤。

当处理组织或裂解血液时，使用标准方法制备单细胞悬浮液。

▲注：死细胞可能与磁珠非特异性结合。为了去除死细胞，我们建议使用密度梯度离心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 10^7 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。

▲ 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（预分离过滤器），以去除可能会堵塞分选柱的细胞团块。使用前用缓冲液湿润过滤器。

▲ 建议孵育温度为 2-8 °C。在冰上操作可能需要延长孵育时间。更高的温度和/或更长的孵育时间可能会导致非特异性细胞标记。

▲ 应滴定小鼠 IgG 一抗，以确定目标细胞最佳标记强度的标记稀释度，并避免背景标记。

1. 细胞计数。

2. 将细胞悬浮液在 300×g 转速下离心 10 分钟。完全吸出上清液。

3. 重悬细胞团，根据说明书的建议用小鼠 IgG 一抗标记。
 4. 每 10^7 个细胞加入 1-2 mL 缓冲液清洗细胞，然后 $300\times g$ 离心 10 分钟。完全吸取上清液。
 5. 可选) 重复洗涤步骤。
 6. 每 10^7 个细胞用 80 μL 缓冲液重悬细胞颗粒。
 7. 每 10^7 细胞加入 20 μL 抗小鼠 IgG 磁珠。
 8. 混匀并在冰箱 (2-8 $^{\circ}\text{C}$) 中孵育 15 分钟。
 9. 可选) 根据说明书的建议加入针对一抗的染色抗体。在冰箱 (2-8 $^{\circ}\text{C}$) 中避光再孵育 5 分钟。
 10. 每 10^7 个细胞加入 1-2 mL 缓冲液清洗细胞， $300\times g$ 离心 10 分钟。完全吸出上清液。
 11. 在 500 μL 缓冲液中重悬最多 10^8 个细胞。
- ▲ 注意:对于更高的细胞数，请相应地扩大缓冲液体积。
12. 进行细胞分选步骤。

二、细胞分选

- ▲ 一定要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 μL

xL: 3 mL

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。加适量的缓冲液，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，这是未标记的细胞。

xM: 3×500 μL

xL: 3×3 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，得到就是磁珠标记的细胞。

xM: 1 mL

xL: 5 mL

7. 可选) 为提高磁性标记细胞的纯度，可在第二个 xM 或 xL 柱上富集洗脱的部分。使用新的分选柱，重复步骤 1 至 6 所述的磁珠分选步骤。