

抗HLA-DR 分选磁珠，人(92-01-0020)

[组分]

人抗 HLA-DR 磁珠：与单克隆小鼠抗 HLA-DR 抗体（同种型：小鼠 IgG1）偶联的磁珠。

[规格] 2mL，可分选 10^9 个细胞总量，多达 100 次分离。

[保存形式] 抗 HLA-DR 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，用抗 HLA-DR 磁珠对 HLA-DR⁺ 细胞进行磁性标记。然后，将细胞悬浮液装入置于分选器磁场的柱中。磁性标记的 HLA-DR⁺ 细胞被保留在柱中，未标记的细胞顺着分选柱流出。将柱从磁场中移出后，磁性保留的 HLA-DR⁺ 细胞可作为正选细胞部分被洗脱出来。

[背景信息]

抗 HLA-DR 磁珠的开发是为了根据 HLA-DR 抗原的表达来分选细胞。HLA-DR 在树突状细胞、B 细胞、单核细胞、巨噬细胞、活化 T 细胞、活化 NK 细胞、造血祖细胞和一些上皮细胞上都有表达。

[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。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。

▲ 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: HLA-DR 阳性细胞可以用 xM、xL 分选柱富集。强表达 HLA-DR 抗原的细胞也可以用 xM、xL 柱进行去除。

● (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

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个核细胞 (PBMC)。

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

当处理组织或溶血时,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(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 $30\ \mu\text{m}$ 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。

▲ 建议孵育温度为 $2-8\ ^\circ\text{C}$ 。温度过高和/或孵育时间过长可能导致细胞标记不特异。在冰上操作可能需要延长孵育时间。

对人 PBMC 或淋巴组织细胞进行磁珠标记

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 $80\ \mu\text{L}$ 缓冲液重悬。
4. 每 10^7 个细胞总量添加 $20\ \mu\text{L}$ 抗 HLA-DR 磁珠。
5. 混匀， $2-8\ ^\circ\text{C}$ 孵育 15 分钟。

▲ 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。

6. (可选) 添加染色抗体，例如： $10\ \mu\text{L}$ Anti-HLA-DR-PE $2-8\ ^\circ\text{C}$ 避光孵育 5 分钟。
7. 每 10^7 个细胞加入 $1-2\ \text{mL}$ 缓冲液洗涤细胞， $300 \times g$ 离心 10 分钟，去上清。
8. 用 $500\ \mu\text{L}$ 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。

9. 进行细胞分选步骤。

磁性标记白膜层细胞

1. 将 2-3 mL 抗凝外周血以 $400\times g$ 离心 35 分钟。小心收集白膜层，体积为 300 μL 。
2. 每 300 μL 白膜层加 60 μL 抗 HLA-DR 磁珠。
3. 混匀并在冰箱（2-8 $^{\circ}\text{C}$ ）中孵育 20 分钟。
4. （可选）加入染色抗体，如 10 μL 抗 HLA-DR-PE，在冰箱（2-8 $^{\circ}\text{C}$ ）中避光孵育 5 分钟。
5. 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。完全吸出上清液。
6. 用 500 μL 缓冲液重悬 10^8 细胞。

▲注：细胞数越多，缓冲液体积应相应增大。

进行细胞分选。

三、细胞分选

▲ 根据总细胞数和阳性细胞数选择合适的分选柱和分离器。

▲ 一定要等到分选柱储液器排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: $3\times 500\ \mu\text{L}$ xL: $3\times 3\ \text{mL}$



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，得到就是磁性标记的细胞。

xM: 1 mL

xL: 5 mL

7. (可选) 为提高 HLA-DR⁺ 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 中所述的磁分离步骤。