

TBD 小鼠中性粒细胞分选试剂盒

产品简介

小鼠中性粒细胞分选试剂盒是通过阴性分选法从小鼠骨髓或其它组织样本的单细胞悬液中分离出中性粒细胞。原理是选用生物素 (biotin) 标记的单克隆抗体对非目标细胞 (非 CD11b⁺ Ly-6G⁺ 细胞) 进行标记, 而后通过链霉亲和素 (streptavidin) 标记的磁珠对非目标细胞进行清除, 从而达到小鼠中性粒细胞分选的目的。分选过程需要用到磁力架。

产品信息

组分名称	规格 (For 10 ⁹ cell)	规格 (For 5×10 ⁸ cell)
Biotin-Antibody Mix	200 μL	100 μL
TBD Streptavidin	2 mL	1 mL

储存条件及有效期

2-8°C 保存, 不可冷冻, 有效期见试管标签。

适用范围

本试剂盒适用于分选小鼠骨髓、外周血或脾脏中性粒细胞。

细胞样品制备

1. 获取小鼠骨髓、脾脏或外周血细胞于离心管中, 进行红细胞裂解。

注意: 红细胞裂解步骤可根据组织样本及所用裂解液的不同调整用量及时间, 通常小鼠外周血红细胞裂解需要的时间更长。少量红细胞残留不会影响分选细胞纯度, 骨髓细胞不裂解红细胞也可直接进行分选, 但分选细胞纯度可能随红细胞占比增加有 5% 以内小幅度下降。

2. 裂解完成后, PBS 重悬细胞, 将细胞悬液用 70 μm 细胞筛网过滤, 500 g, 离心 5 min。

注意: 细胞悬液需要过细胞筛网, 以除去组织和细胞团块, 否则会影响后续细胞分选纯度。

3. 离心完成后, 将细胞重悬于分选 Buffer, 洗涤细胞, 500 g 离心 5 min, 弃上清。

注意: 分选 buffer 为含有 2 mM EDTA 和 2% 胎牛血清 (FBS) 的 PBS 或者含有 2 mM EDTA 和 0.5% BSA 的 PBS, 需预先通过 0.22 μm 滤膜过滤除菌。

4. 将细胞重悬于分选 buffer 中, 调整细胞密度为 1×10⁸ cells/mL。

分选流程

1. 将 100 μL 细胞悬液 (1×10⁷ 个细胞) 加入 1.5 mL 离心管底部, 再加入 2 μL Biotin-Antibody Mix, 混匀后 4°C 孵育 10 min。

注意: 加入细胞悬液时将细胞加入离心管底部, 避免沿管壁加入。如果分选更多细胞, 则按比例增加 Biotin-Antibody Mix 的用量。

2. 孵育完成后, 洗涤细胞 1 次: 补分选 Buffer 至 1.5 mL, 500 g 离心 5 min。

注意: 若分选的细胞数目过多, 则使用 15 mL 离心管, 补分选 Buffer 至 5-10 mL 后离心。

3. 离心完成后, 弃上清, 用 100 μL 分选 Buffer 重悬细胞。

注意: 如果分选更多细胞, 则按比例增加分选 buffer 用量。

4. 在离心管中加入 20 μL 清洗过的 TBD Streptavidin (磁珠使用前需要用分选 buffer 进行清洗: 涡旋振荡重悬磁珠, 吸取实验需要的磁珠至 1.5 mL 离心管, 加入 1 mL 分选 buffer, 10000 g 离心 1 min, 弃上清。加入 1 mL 分选 buffer 重复洗涤磁珠 1 次后用与原来相同体积的分选 buffer 重悬磁珠。如吸取 20 μL 磁珠进行清洗, 则清洗后用 20 μL 分选 buffer 进行重悬), 充分混匀后 4°C 孵育 10 min。

注意: 如果分选更多细胞, 则按比例增加 TBD Streptavidin 用量。例如分选 5×10⁷ 个细胞, 在 500 μL 细胞悬液中加入 10 μL Biotin-Antibody Mix 和 100 μL TBD Streptavidin。如果分选少于 1×10⁷ 个细胞,

则将细胞悬液体积补至 100 μL, 加入 2 μL Biotin-Antibody Mix 和 20 μL TBD Streptavidin。

5. 孵育完成后, 转移至流式管中, 补分选 buffer 至 2.5 mL, 用移液器上下混合充分混匀 (避免剧烈振荡或者上下颠倒混匀)。

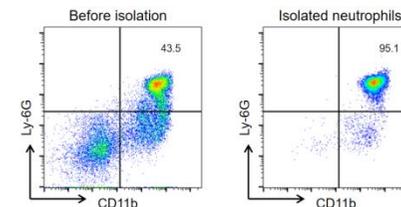
6. 将含有细胞的分选流式管置于磁力架上, 静置 5 min。

7. 将细胞悬液轻柔倒入一个无菌离心管中 (倾倒过程中流式管不要脱离磁力架), 此细胞悬液中即包含纯化的小鼠中性粒细胞, 500 g, 离心 5 min。离心后弃上清, 收集细胞。

8. 根据实验需要洗涤细胞后, 将细胞重悬于所需缓冲液或培养基中, 即可用于后续分子生物学或细胞生物学实验。

分选效果

从 C57BL/6 小鼠骨髓细胞中分选中性粒细胞, 分选前后的细胞用 FITC anti-mouse Ly-6G 抗体 (克隆号 1A8) 和 PE anti-mouse CD11b 抗体 (克隆号 M1/70) 标记后进行流式细胞仪分析, 分选前后的中性粒细胞纯度分别为 43.5% 和 95.1%。



注意事项

1. 磁珠和抗体混合液使用和保存过程中均应避免冷冻;
2. 建议选用低吸液器吸头和离心管, 避免因吸附造成磁珠和抗体的损耗;
3. 本产品需与磁性分离器配套使用;
4. 本产品仅供研究使用。



细胞分选/富集试剂盒说明书合集

