

# 人中性粒细胞分选试剂盒

## ➤ 产品描述:

人中性粒细胞分选试剂盒是通过阴性分选法从新鲜外周血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, 从而达到人中性粒细胞分选的目的。分选过程需要用到磁力架。

## ➤ 规格和组分:

组分名称	Cat.No.:RG11-704-100 规格 (For $1 \times 10^9$ cells)	Cat.No.:RG11-704-50 规格 (For $5 \times 10^8$ cells)
Biotin-Antibody Mix	200 $\mu$ L	100 $\mu$ L
Streptavidin-Beads	2 mL	1 mL

➤ **储存条件:** 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新鲜人外周血中性粒细胞, 分选之前需去除红细胞。

## ➤ 样本制备:

1. 取新鲜抗凝外周血于离心管中, 加入红细胞裂解液, 进行红细胞裂解。

**注意:** 红细胞裂解步骤可根据所用裂解液的不同调整用量及时间。一般建议加入相当于外周血体积3-5倍的红细胞裂解液, 在4°C或冰上进行裂解。如一次裂解不充分, 可进行第二次裂解。少量红细胞残留通常不会影响后续细胞分选的纯度。

2. 红细胞裂解完成后, 用PBS重悬细胞沉淀, 经过细胞筛网过滤后400 g, 离心5 min。

3. 弃上清, 加入PBS重复洗涤一次, 以充分去除裂解液及细胞碎片。

4. 洗涤完成后, 弃上清, 将细胞重悬于分选buffer中, 调整细胞密度为 $1 \times 10^8$  cells/mL。

**注意:** 分选buffer为含有2 mM EDTA和2% 胎牛血清 (FBS) 的PBS, 需预先通过0.22  $\mu$ m滤膜过滤除菌。

## ➤ 操作流程:

1. **抗体标记非目的细胞:** 将100  $\mu$ L细胞悬液 ( $1 \times 10^7$ 个细胞为例) 加入1.5 mL离心管底部, 随后加入2  $\mu$ L Biotin-Antibody Mix, 充分混匀后室温孵育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. 磁珠预处理:** 涡旋震荡重悬磁珠 (Streptavidin-Beads), 吸取20  $\mu$ L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。重复洗涤1次。清洗后用20  $\mu$ L分选buffer进行重悬。

**注意:** buffer与磁珠最终是1:1等比例混匀, 如清洗50  $\mu$ L磁珠 (Streptavidin-beads), 则最终用50  $\mu$ L buffer重悬。

**3. 磁珠孵育:** 加入20  $\mu$ L预处理过的Streptavidin-Beads混悬液, 轻轻混匀, 室温孵育10 min。

**注意:** 说明书以 $1 \times 10^7$ 个细胞量举例, 如果分选更多细胞, 则按比例增加Streptavidin-Beads用量。

**4. 转移:** 孵育完成后, 将细胞和磁珠混合液转移至流式管中, 补分选buffer至2.5 mL, 用移液器上下吹打充分混匀。

**5. 磁珠吸附:** 将流式管置于磁力架上, 静置5 min, 使磁珠吸附。

**6. 收集细胞:** 手持磁力架, 将细胞悬液轻柔倒入无菌离心管中, 此细胞悬液中即包含纯化的人中性粒细胞。

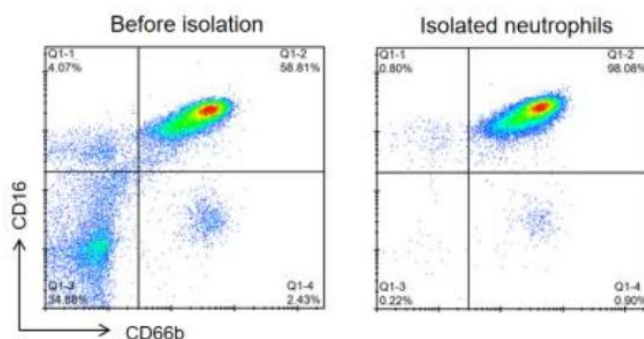
**注意:** 倾倒过程中流式管不要脱离磁力架。

**7. 洗涤与重悬:** 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。

### ➤ 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. 建议选用低吸附移液器吸头和离心管, 避免因吸附造成磁珠和抗体的损耗;
3. 如果单次分选少于 $1 \times 10^7$  cells, 则将细胞悬液体积补至100  $\mu$ L, 加入2  $\mu$ L Biotin-Antibody Mix和20  $\mu$ L Streptavidin-Beads;
4. 本产品需与磁性分离器配套使用;
5. 本产品仅供研究使用。

### ➤ 分选效果:



从人外周血中分选中性粒细胞, 分选前后的细胞用Alexa Fluor 647标记的anti-human CD66b抗体 (克隆号6/40c) 和FITC标记的anti-human CD16抗体 (克隆号3G8) 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58.81%和98.08%。