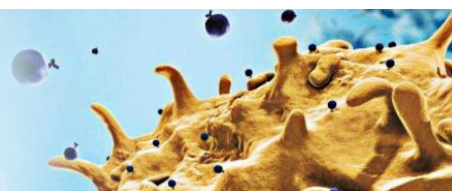




Precision BioMedicals Co., Ltd.

金准生物医药科技(天津)有限公司



Anti-Biotin 阳性分选试剂盒

Anti-Biotin Positive Selection kit

货 号: 603105 50 次
603110 100 次
603120 200 次

储 存: 2-8°C。不可冷冻。

有 效 期: 详见试剂瓶

注意事项: 为保证分选的细胞不被污染, 请在生物安全柜中执行所有细胞分选步骤。

产品介绍

Anti-Biotin 阳性分选试剂盒用于阳性分选生物素化抗体标记的细胞, 其利用生物素化抗体标记目的细胞, 再用 Anti-Biotin 超顺磁纳米微珠结合被标记的细胞; 当细胞悬液置于磁极中时, 被磁珠结合的目的细胞滞留在磁场中, 非目的细胞在细胞悬液中游离, 并可通过倾倒去除。

阳性分选磁珠也可用于使用单一生物素化抗体标记不需要的细胞。对于使用多种抗体标记被去除的细胞, 我们建议使用 Anti-Biotin 阴性分选试剂盒进行去除分选方案。

成 分

1. ImunoSep™ Anti-Biotin 阳性分选试剂。

使用剂量: 通常在 100 μ L 体系中, 使用 Anti-Biotin 阳性分选试剂 (20 μ L/次) 标记被生物素化抗体标记的 1×10^7 细胞。如果细胞数量不足 1×10^7 细胞, 使用试剂量请按照一次分选所使用的试剂量标记细胞, 进行细胞分选。

为了取得较好的分选效果, 建议分选实验时进行分选试剂的剂量优化。阳性分选磁珠的用量取决于分选样品中的抗原表达量以及目的细胞含量。生物素化抗体和 Anti-Biotin 阳性分选试剂的最佳浓度须凭经验确定。

实验步骤

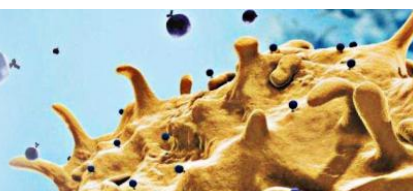
以下实验方法是用于 Anti-Biotin 阳性分选试剂盒阳性分选目的细胞的一般实验步骤。在阳性分选中, 用生物素化抗体标记目的细胞, 再用 Anti-Biotin 阳性分选微珠结合被标记的细胞。当细胞悬液置于磁极中时, 被标记的目的细胞滞留在磁场中, 而非目的细胞在溶液中保持游离, 可通过倾倒去除。用于分选的生物素化抗体的最佳浓度取决于特异性和克隆, 与用于流式细胞术分析的最佳浓度不同。阳性分选磁珠的用量取决于分选样品中的抗原表达量以及目的细胞含量。生物素化抗体和 Anti-Biotin 阳性分选试剂的最佳浓度须凭经验确定。

警 告

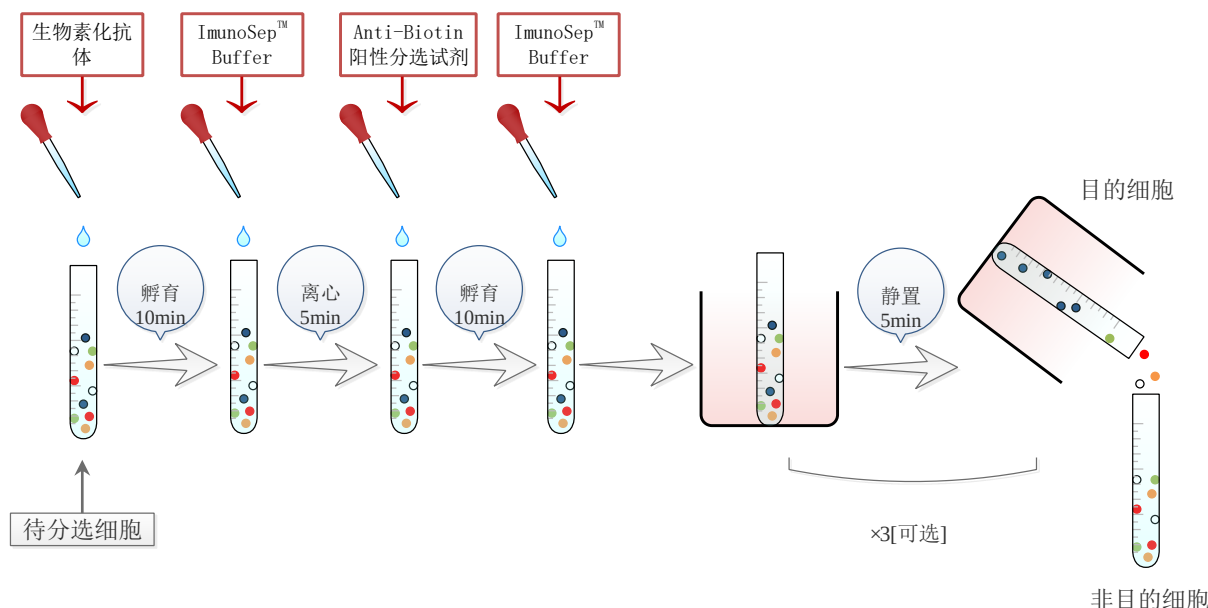
分选磁极可产生强磁场。远离心脏起搏器、信用卡、磁性 ID 卡、手表、电脑显示器和硬盘等电子设备, 以防损坏仪器设备。

A. 细胞准备

1. 对于小鼠脾细胞或淋巴细胞, 建议使用 40 μ m 细胞过滤器, 过滤单细胞悬液去除碎屑或细胞团块, 以获得最佳试剂盒分选性能。
2. 有关正常人外周血单个核细胞的制备, 建议彻底清洗单个核细胞, 去除血小板, 以获得最佳的细胞分选效果。
3. 建议使用分选缓冲液 ImunoSep™ Buffer (含 EDTA)。



B. 实验步骤



步骤 I：优化细胞分选抗体的浓度：

1. 用适当体积的 ImunoSep™ Buffer 重悬细胞，调整细胞浓度至 1×10^8 / mL (100 μ L 细胞悬液中含 1×10^7 细胞)，制备单细胞悬液。
2. 在 12 $\times$ 75 mm, 5 mL 流式管中放置所需数量的细胞 (推荐 1×10^7)，但不超过 2×10^8 细胞 (建议最少 4 个流式管)。
3. 将生物素化抗体倍比稀释 (即 1:2:4:8 稀释) 添加至细胞中。类似优化流式细胞染色时抗体浓度的优化以确定抗体的最佳浓度；利用 1 mL Tip 吹打 5 次或涡旋仪震荡混匀，在室温下孵育 10 分钟。
4. 加入 ImunoSep™ Buffer 至 4 mL，洗涤细胞，然后在室温下以 300 $\times$ g 离心 5 分钟。
5. 弃去上清液，用 ImunoSep™ Buffer 重悬细胞至其初始体积。
6. 每 100 μ L 细胞添加推荐量的 Anti-Biotin 阳性分选微珠 (见下文)。用 1 mL Tip 吹打 5 次混匀。在室温下孵育 10 分钟。

Anti-Biotin 阳性分选微珠推荐体积	
目的细胞含量	推荐体积
>50%	40 μ L
10-50%	20 μ L
<10%	10 μ L

注意：阳性分选微珠在添加到细胞之前，必须用 1mL Tip 混合均匀，以确保最佳分选效果。

7. 添加 ImunoSep™ Buffer 至 2.5 mL。用 1 mL Tip 吹打 3

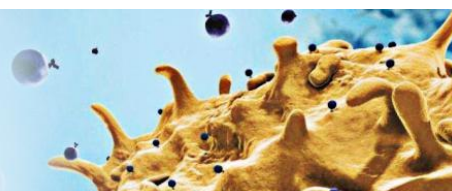
次混合均匀，请勿涡旋混匀。

8. 将盛有细胞悬液的 5 mL 流式管插入磁极中，使流式管底部通过磁极底部孔道，直至接触到工作台面。在室温条件下静置 5 分钟。
9. 保持流式管在磁极中，将磁极和流式管一起拿起，快速将上清液倾倒入 15 mL 离心管中。流式管倒置时长不可超过 2 秒，随即将其恢复到直立位置。
注意：请勿晃动或摇动磁极中倒置的流式管，以免降低分选细胞的纯度。
10. 从磁极中取出含有结合细胞的流式管，再重复步骤 7 至 9，共洗涤 3 次。
11. 从磁极中取出含目的细胞的流式管，加入 1 mL ImunoSep™ Buffer。通过吸取 ImunoSep™ Buffer 来清洗管壁上的目的细胞。
12. 用流式抗体特异性标记目的细胞和非目的细胞。
13. 经流式分析，基于目的细胞的纯度和/或回收率，选择确定生物素化抗体的最佳浓度。

步骤 II：优化 Anti-Biotin 阳性分选微珠：

1. 如果在上述步骤 I 之后需要额外的优化分选微珠的浓度，可以按照如下操作优化 Anti-Biotin 阳性分选微珠的浓度。
2. 用适当体积的 ImunoSep™ Buffer 重悬细胞，调整细胞浓度至 1×10^8 / mL (100 μ L 细胞悬液中含 1×10^7 细胞)，制备单细胞悬液。

注意：细胞必须是单细胞悬液。如有必要，进行涡旋振荡或用移液管



移除团块, 然后再继续细胞分选。

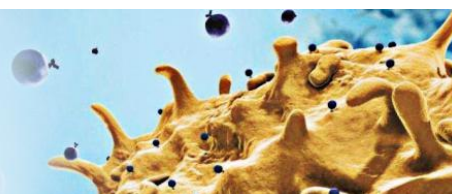
3. 在几个 12×75 mm, 5 mL 流式管中(建议最少 3 个试管)放置所需数量的细胞(推荐 1×10^7), 但不超过 2×10^8 细胞。
4. 如上文步骤 I 中所示, 向每个流式管中加入最佳浓度的生物素化抗体。通过涡旋震荡或用 1 mL Tip 混匀。在室温下孵育 10 分钟。
5. 加入 ImunoSep™ Buffer 至 4 mL, 洗涤细胞, 然后在室温下以 $300 \times g$ 离心 5 分钟。
6. 弃去上清液, 用 ImunoSep™ Buffer 重悬细胞至其初始体积。
7. 添加 Anti-Biotin 阳性分选微珠, 其比例为步骤 I, 第 6 步中, 每 100 μ L 细胞使用量的 2 倍, 1 倍和 0.5 倍。用 1 mL Tip 吹打 5 次混匀。在室温下孵育 10 分钟。
注意: Anti-Biotin 阳性分选微珠在添加到细胞之前, 必须用 1 mL Tip 混合均匀, 以确保最佳分选效果。
8. 添加分选缓冲液至 2.5 mL。用 1 mL Tip 吹打 3 次混合均匀, 请勿涡旋混匀。
9. 将盛有细胞悬液的 5 mL 流式管插入磁极中, 使流式管底部通过磁极底部孔道, 直至接触到工作台面。在室温条件下静置 5 分钟。
10. 保持流式管在磁极中, 将磁极和流式管一起拿起, 快速将上清液倾倒入 15 mL 离心管中。流式管倒置时长不可超过 2 秒, 随即将其恢复到直立位置。
注意: 请勿晃动或摇动磁极中倒置的流式管, 以免降低分选细胞的纯度。
11. 从磁极上取出含有结合细胞的流式管, 再重复步骤 8 至 10 两次, 共洗涤 3 次。
12. 从磁极中取出含有目的细胞的流式管, 加入 1 mL ImunoSep™ Buffer。通过吸取 ImunoSep™ Buffer 来清洗流管壁上的目的细胞。
13. 用流式抗体特异性标记目的细胞和非目的细胞。
13. 经流式分析, 基于目的细胞的纯度和/或回收率, 确定最佳 Anti-Biotin 阳性分选微珠使用量。

步骤III: 使用优化条件正确分选目的细胞:

1. 用适当体积的 ImunoSep™ Buffer 重悬细胞, 调整细胞浓度至 1×10^8 / mL (100 μ L 细胞悬液中含 1×10^7 细胞), 制备单细胞悬液。

注意: 细胞必须是单细胞悬液。如有必要, 进行涡旋振荡或用移液管移除团块, 然后再继续细胞分选。

2. 在 12×75mm, 5 mL 流式管中放置所需数量的细胞, 但不超过 2×10^8 细胞。
3. 依据步骤 I 中所示, 在流式管中加入最佳浓度的生物素化抗体标记细胞。用 1 mL Tip 吹打 5 次混匀。在室温下孵育 10 分钟。
4. 加入 ImunoSep™ Buffer 至 4 mL, 洗涤细胞, 然后在室温下以 $300 \times g$ 离心 5 分钟。
5. 弃去上清液, 用 ImunoSep™ Buffer 重悬细胞至其初始体积。
6. 依据步骤 II 中所确定的分选微珠使用量, 每 100 μ L 细胞添加最佳量的 Anti-Biotin 阳性分选微珠。用 1 mL Tip 吹打 5 次混匀。在室温下孵育 10 分钟。
注意: Anti-Biotin 阳性分选微珠在添加到细胞之前, 必须用 1 mL Tip 混合均匀, 以确保最佳分选效果。
7. 添加 ImunoSep™ Buffer 至 2.5 mL。用 1 mL Tip 吹打 3 次混匀。
8. 将盛有细胞悬液的 5 mL 流式管插入磁极中, 使流式管底部通过磁极底部孔道, 直至接触到工作台面。在室温条件下静置 5 分钟。
9. 保持流式管在磁极中, 将磁极和流式管一起拿起, 快速将上清液倾倒入 15 mL 离心管中。流式管倒置时长不可超过 2 秒, 随即将其恢复到直立位置。
注意: 请勿晃动或摇动磁极中倒置的流式管, 以免降低分选细胞的纯度。
10. 从磁极中取出含有结合细胞的流式管, 再重复步骤 7 至 9, 共洗涤 3 次(依据细胞量和纯度的需求, 可洗涤 1-3 次)。
11. 从磁极中取出含有目的细胞的流式管, 加入 1 mL ImunoSep™ Buffer。通过吸取 ImunoSep™ Buffer 来清洗管壁两侧的目的细胞。收集到的阳性分选的细胞可进行下游实验。



故障排除指南

注意：标记未结合细胞以确定未分选的目的细胞数量，可以为进一步的故障排除提供有用的信息。

问题	可能原因	解决方法
A. 纯度低	1. 如果在未标记阴性细胞群中仅含有少量目的细胞，说明非特异性结合非目的细胞。	1. 减少生物素化抗体用量。
	2. 如果在未标记阴性细胞群中仅含有大量目的细胞，说明目的细胞标记不充分。	2. 增加 Anti-Biotin 阳性分选微珠用量和/或增加生物素化抗体用量。
	3. 抗体不适合。	3. 如果其它可选的抗体，尝试使用其它克隆号抗体。
	4. 洗涤细胞次数不够。	4. 增加步骤Ⅲ，10 中的细胞洗涤次数。
B. 回收率低 (产量)	1. 目的细胞结合不充分	1. 增加生物素化抗体和/或 Anti-Biotin 阳性分选微珠用量。
	2. 抗体不适合	2. 如果其它可选的抗体，尝试使用其它克隆号抗体。
	3. 过量的生物素化抗体去除不足	3. 与生物素化抗体孵育后，增加洗涤次数或者洗涤液体积。
	4. 使用培养基作为细胞分离液使用	4. 不要用细胞培养基作为细胞分离液。在添加微珠之前，使用推荐的 ImunoSep™ Buffer 洗涤细胞。
	5. 洗涤步骤过多	5. 减少在步骤Ⅲ，10 中的细胞洗涤次数。
	6. Anti-Biotin 阳性分选微珠性能损失	6. 不要冷冻 Anti-Biotin 阳性分选微珠。
C. 目的细胞的散射高	1. 微珠结合过多	1. 减少生物素化抗体和/或 Anti-Biotin 阳性分选微珠用量。
	2. 抗体不适合	2. 如果其它可选的抗体，尝试使用其它克隆号抗体。
	3. 过量的生物素化抗体去除不足	3. 与生物素化抗体孵育后，增加洗涤次数或者洗涤液体积。