



# CD11b 微试管

## 小鼠/人类

订单号 130-049-601

## 磁性细胞分拣

### 索引

#### 1. 说明

##### 1.1 MACS® 分离原理

##### 1.2 背景和产品应用

##### 1.3 试剂和仪器要求

#### 2. 规程

##### 2.1 样品制备

##### 2.2 对人类 PBMC 进行磁性标记

##### 2.3 小鼠细胞的磁性标记

##### 2.4 磁分离

#### 3. 使用 CD11b MicroBeads 进行分离的示例

#### 4. 参考资料

### 1. 说明

组件	2 mL CD11b MicroBeads, 小鼠/人: 与单克隆大鼠抗小鼠/人 CD11b (Mac-1 $\alpha$ ) 抗体 (同种型: 大鼠 IgG2b; 克隆: M1/70.15.11.5) ) 连接的微胶囊。
大小	适用于 $1 \times 10^9$ 人体细胞, 最多可分离 100 次; $2 \times 10^9$ 个小鼠总细胞, 最多可分离 200 次。
产品规格	CD11b MicroBeads 以含有稳定剂和 0.05% 叠 氮化钠的悬浮液形式供应。
储存	避光保存, 温度为 4-8 °C。请勿冷冻。有效期 标注在小瓶标签上。

#### 1.1 MACS® 分离原理

首先用 CD11b MicroBeads 对 CD11b<sup>+</sup> 细胞进行磁性标记。然后将细胞悬浮液装入 MACS® 柱, 再将其置于 MACS 分离器的磁场中。磁性标记的 CD11b<sup>+</sup> 细胞被保留在柱上。未标记的细胞流过, 这部分细胞中的 CD11b<sup>+</sup> 细胞被清除。从磁场中移除色谱柱后, 磁性标记的 CD11b<sup>+</sup> 细胞可作为正选细胞部分被洗脱出来。

#### 1.2 背景和产品应用

CD11b MicroBeads 是根据 CD11b 抗原的表达情况开发的, 用于分离人和小鼠细胞。在人体内, CD11b 在骨髓细胞上强表达, 在 NK 细胞和一些活化淋巴细胞上弱表达。在小鼠中, CD11b 抗原在单核细胞/巨噬细胞中表达, 在粒细胞、NK 细胞、CD5<sup>+</sup> B1 细胞和树突状细胞亚群中表达较少。

CD11b (Mac-1  $\alpha$ ; 整合素  $\alpha_M$  链) 抗体与 CD11b/CD18 异源二聚体 (Mac-1,  $\alpha_M\beta_2$  integrin) 的 170 kDa  $\alpha_M$  亚基发生反应。它是补体 (C3bi)、纤维蛋白原或凝血因子 X 的受体。

应用实例

- 外周血或淋巴组织中人类单核细胞/巨噬细胞和粒细胞的阳性选择或耗竭。
- 人和小鼠骨髓中髓系细胞的阳性选择或耗竭。
- 淋巴组织中小鼠巨噬细胞的阳性选择或耗竭。

1.3 试剂和仪器要求

- 缓冲液（脱气）：用 autoMACS™ 冲洗液（# 130-091-222）稀释 MACS BSA 储存液（# 130-091- 376），配制含有 pH 值为 7.2 的 PBS（磷酸盐缓冲液）、0.5% BSA（牛血清白蛋白）和 2 mM EDTA 的溶液。保持缓冲液低温（4-8 °C）。
- 注：EDTA 可由其他补充剂代替，如抗凝剂柠檬酸盐葡萄糖配方-A（ACD-A）或柠檬酸盐磷酸葡萄糖（CPD）。BSA 可由其他蛋白质代替，如明胶、小鼠/人血清或胎牛血清。不建议使用含  $Ca^{2+}$  或  $Mg^{2+}$  的缓冲液或培养基。
- MACS 色谱柱和 MACS 分离器：使用 MS、LS 或 XS 色谱柱可富集（阳性选择）或去除单核细胞和巨噬细胞。为了有效地去除骨髓中的髓系细胞以及粒细胞和 NK 细胞，我们建议使用 LD、CS 或 D 色谱柱。也可使用

autoMACS 分离器进行阳性选择或耗竭。

专栏	最大标记细胞数	最大细胞总数	分离器
<b>正向选择</b>			
MS	107	2×108	MiniMACS, OctoMACS、VarioMACS, SuperMACS
LS	108	2×109	MidiMACS, QuadroMACS、VarioMACS, SuperMACS
XS	109	2×1010	超级 MACS
<b>损耗</b>			
LD	108	5×108	MidiMACS, QuadroMACS、VarioMACS, SuperMACS
CS	2×108		VarioMACS, SuperMACS
D	109		超级 MACS
<b>正向选择或损耗</b>			
自动 MACS	2×108	4×109	自动 MACS

注：将某些色谱柱插入 VarioMACS™ Separator 或 SuperMACS™ Separator 时需要色谱柱适配器。有关详情，请参阅 MACS Separator 数据表。

- （可选）用于流式细胞计数分析的含荧光色素的 CD11b 抗体，如 CD11b-FITC（# 130-081-201）、CD11b-PE（# 130-091-240）或 CD11b-APC（# 130-091-241）。

Miltenyi Biotec

Miltenyi Biotec GmbH  
Friedrich-Ebert-Str.  
德国 51429 Bergisch Gladbach  
电话 +49-2204-8306-0 传真 +49-2204-85197

www.miltenyibiotec.com 

Miltenyi Biotec Inc.  
2303 Lindbergh Street, Auburn, CA 95602, USA  
电话 800 FOR MACS, 530 888-8871  
传真：530 888-8925

- (可选) PI (碘化丙啶) 或 7-AAD, 用于以流式细胞计数法排除死细胞。
- (可选) 预分离过滤器 (# 130-041-407) 用于去除细胞团块。

## 2. 规程

### 2.1 样品制备

#### 人类 PBMC 样品制备

在处理抗凝外周血或缓冲液时, 应通过密度梯度离心分离外周血单核细胞 (PBMC) (请参阅《用户手册》中的 "一般规程" 或访问 [www.miltenyibiotec.com/protocols](http://www.miltenyibiotec.com/protocols))。

**注:** 密度梯度分离后去除血小板: 将细胞颗粒重悬于缓冲液中, 200×g 离心 10-15 分钟, 温度 20°C。小心去除上清液。重复洗涤步骤, 小心去除上清液。

#### 小鼠组织样本制备

处理组织时, 请使用标准制备方法制备单细胞悬液 (请参阅《用户手册》中的 "一般规程" 或访问 [www.miltenyibiotec.com/protocols](http://www.miltenyibiotec.com/protocols))。

**注意:** 死细胞可能会与 MACS MicroBeads 发生非特异性结合。如果死细胞数量较多, 建议使用密度梯度离心法或死细胞去除试剂盒 (# 130-090-101) 去除死细胞。



### 2.2 对人类 PBMC 进行磁性标记

▲ 快速工作, 保持细胞低温, 使用预冷溶液。这将防止抗体在细胞表面封盖和非特异性细胞标记。

▲ 下面给出的磁性标记体积最多适用于  $10^7$  个细胞。当处理的细胞数少于  $10^7$  个时, 请使用所示的相同体积。当处理的细胞数较多时, 应相应增加所有试剂体积和总体积 (例如, 细胞总数为  $2 \times 10^7$  时, 所有标注的试剂体积和总体积应为原来的两倍)。

▲ 为获得最佳性能, 在磁性分离前必须获得单一细胞悬浮液。将细胞通过 30 微米尼龙网 (预分离过滤器 # 130-041-407), 以去除可能会堵塞柱子的细胞团块。

1. 确定细胞数量。
2. 将细胞悬浮液在 300×g 转速下离心 10 分钟。用吸管完全吸去上清液。
3. 每  $10^7$  个细胞用 80  $\mu$ L 缓冲液重悬细胞团。

4. 每  $10^7$  个细胞加入 20  $\mu$ L CD11b MicroBeads。

5. 混合均匀并在 4-8 °C 下培养 15 分钟。

**注意:** 在冰上操作可能需要延长孵育时间。更高的温度和/或更长的孵育时间会导致非特异性细胞标记。

6. (可选) 加入荧光共轭抗体, 如加入 10  $\mu$ L CD11b-FITC (# 130-081-201), 在 4-8 °C 下孵育 5 分钟。

7. 每  $10^7$  个细胞加入 1-2 mL 缓冲液清洗细胞, 然后在 300×g 转速下离心 10 分钟。用吸管完全吸去上清液。

**Miltenyi Biotec**

[www.miltenyibiotec.com](http://www.miltenyibiotec.com)



本 MACS® 产品仅供体外研究使用, 不得用于诊断或治疗程序。

- 将最多  $10^8$  个细胞重悬于 500  $\mu\text{L}$  缓冲液中。

**注：**细胞数越多，缓冲液容量应相应增大。

**注：**使用 LD 柱进行去污时，最多将  $1.25 \times 10^8$  个细胞重悬于 500  $\mu\text{L}$  缓冲液中。

- 进行磁分离 (2.3)。

## 2.3 小鼠细胞的磁性标记

▲ 快速工作，保持细胞低温，使用预冷溶液。这将防止抗体在细胞表面封盖和非特异性细胞标记。

▲ 下面给出的磁性标记体积最多适用于  $10^7$  个细胞。当处理的细胞数少于  $10^7$  个时，请使用所示的相同体积。当处理的细胞数较多时，应相应增加所有试剂体积和总体积（例如，细胞总数为  $2 \times 10^7$  时，所有标注的试剂体积和总体积应为原来的两倍）。

▲ 为获得最佳性能，在磁性分离前必须获得单一细胞悬浮液。将细胞通过 30 微米尼龙网（预分离过滤器 # 130-041-407），以去除可能会堵塞柱子的细胞团块。

- 确定细胞数量。
- 将细胞悬浮液在  $300 \times g$  转速下离心 10 分钟。用吸管完全吸去上清液。
- 每  $10^7$  个细胞用 90  $\mu\text{L}$  缓冲液重悬细胞团。
- 每  $10^7$  个细胞加入 10  $\mu\text{L}$  CD11b MicroBeads。
- 混合均匀并在  $4-8^\circ\text{C}$  下培养 15 分钟。

**注意：**在冰上操作可能需要延长孵育时间。温度过高和/或孵育时间过长会导致非特异性细胞标记。

- （可选）加入荧光共轭抗体，如加入 10  $\mu\text{L}$  CD11b-FITC（# 130-081-201），在  $4-8^\circ\text{C}$  下孵育 5 分钟。
- 每  $10^7$  个细胞加入 1-2 mL 缓冲液清洗细胞，然后在  $300 \times g$  转速下离心 10 分钟。用吸管完全吸去上清液。
- 将最多  $10^8$  个细胞重悬于 500  $\mu\text{L}$  缓冲液中。

**注：**细胞数越多，缓冲液容量应相应增大。

**注：**使用 LD 柱进行去污时，最多将  $1.25 \times 10^8$  个细胞重悬于 500  $\mu\text{L}$  缓冲液中。

- 进行磁分离 (2.3)。

## 2.4 磁分离

▲ 根据总细胞数和  $\text{CD11b}^+$  细胞数选择合适的 MACS 色谱柱和

**Miltenyi Biotec**

本 MACS® 产品仅供 **体外** 研究使用，不得用于诊断或治疗程序。

MACS 分离器（见第 1.3 节表格）。

## 使用 MS 或 LS 色谱柱进行磁分离

- 将色谱柱放入合适的 MACS 分离器的磁场中（见“色谱柱数据表”）。

- 用适量缓冲液冲洗色谱柱：MS：500  $\mu\text{L}$       LS：3



3. 将细胞悬浮液涂抹在色谱柱上。
4. 收集通过的未标记细胞，用适量缓冲液清洗色谱柱。通过三次添加缓冲液来完成清洗步骤，每次都要在色谱柱储液槽清空后进行。

MS: 3×500  $\mu$ L : 3×3 mL。  
收集总流出物。这是未标记的细胞部分。

5. 从分离器中取出色谱柱，放在合适的收集管上。
6. 将适量的缓冲液移到色谱柱上。使用色谱柱附带的活塞，立即冲出带有磁性标记细胞的馏分。

MS: 1 mL : 5 mL。

▲注：为提高磁性标记馏分的纯度，可将其通过新制备的色谱柱。

### 使用 XS 色谱柱进行磁分离

有关色谱柱组装和分离的说明，请参阅"XS 色谱柱数据表"。

### 使用 LD 色谱柱进行损耗

1. 将 LD 色谱柱放入合适的 MACS 分离器的磁场中（见"LD 色谱柱数据表"）。
2. 用 2 毫升缓冲液冲洗色谱柱。
3. 将细胞悬浮液涂抹在色谱柱上。
4. 收集通过并清洗色谱柱的未标记细胞  
用 2×1 毫升缓冲液。收集总流出物。这是未标记的细胞分数。

### CS 柱的损耗

1. 组装希尔思色谱柱，并将其置于合适的 MACS 分选机的磁场中（参见"希尔思色谱柱数据表"）。
2. 准备色谱柱，注入 60 mL 缓冲液并冲洗。在组装好的色谱柱的 3 通截止阀上安装一个 22G 流量电阻器（见"CS 色谱柱数据表"）。
3. 将细胞悬浮液涂抹在色谱柱上。
4. 收集通过的未标记细胞，用 30 mL 缓冲液从顶部清洗色谱柱。收集总流出物。这是未标记的细胞部分。

### D 栏耗尽

有关色谱柱组装和分离的说明，请参阅"D 色谱柱数据表"。

### 使用 autoMACS™ 分离器进行磁分离

▲注意：程序选择取决于隔离策略、磁性标记强度和磁性标记细胞的频率。详见《autoMACS 用户手册》："autoMACS 细胞分离程序"。

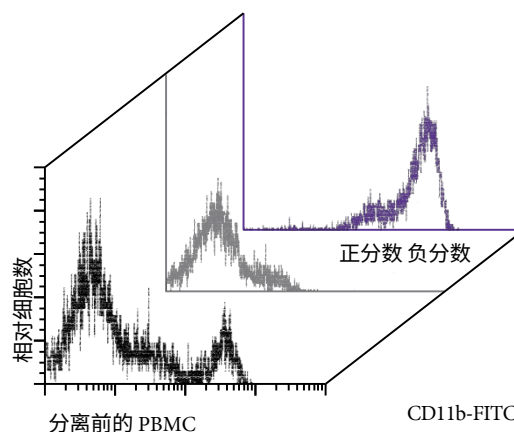
3. 使用"Posel"程序时，收集阳性部分（出口端口"pos1"）。这是纯化的 CD11b+ 细胞部分。

使用"Depletes"程序时，收集未标记的部分（出口端口"neg1"）。这就是 CD11b 细胞部分。

## 3. 使用 CD11b MicroBeads 进行分离的示例

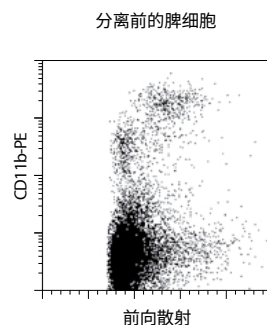
### A：分离人类 PBMC

使用 CD11b MicroBeads 分离人 PBMC。细胞用 CD11b-FITC (# 130-081-201) 染色。单核细胞可被鉴定为 CD11b<sup>bright</sup> 细胞，NK 细胞可被鉴定为 CD11b<sup>dim</sup> 细胞。



### B：从小鼠脾脏细胞悬液中分离 CD11b+ 细胞

使用 CD11b MicroBeads、MS 色谱柱和 MidiMACS™ 分离器从小鼠脾脏细胞悬液中阳性筛选 CD11b+ 细胞。



▲ 有关如何使用  
autoMACS 分离器的

说明，请参阅《  
autoMACS™ 用户手

**Miltenyi Biotec**

www.miltenyibiotec.com



本 MACS™ 产品仅供体外研究使用，不得用于诊断  
或治疗程序。

册》。

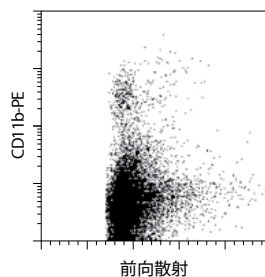
订单号 130-049-601

1. 准备自动 MACS 汽水分离器并填料。
2. 将装有磁性标记细胞的试管放入 autoMACS 分离器中。要进行标准分离，请选择以下分离程序：

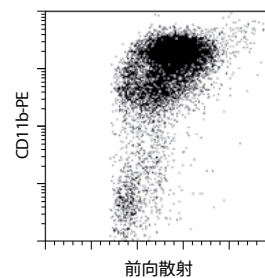
正面选择：消耗"消耗"

耗尽 CD11b+ 细胞后的脾脏细

胞



分离的 CD11b+ 细胞



140-000-059-05

**Miltenyi Biotec**

[www.miltenyibiotec.com](http://www.miltenyibiotec.com)



本 MACS® 产品仅供**体外**研究使用，不得用于诊断  
或治疗程序。

## 4. 参考资料

1. Ehlich, A; Martin, VM; Müller, W; Rajewsky, K (1994) Analysis of the B Cell Progenitor Compartment at the Level of Single Cells. Current Biology 4: 573-583.[33]

### 警告

试剂中含有叠氮化钠。叠氮化钠在酸性条件下会产生极毒的肼酸。叠氮化合物应在丢弃前用自来水稀释。建议采取这些预防措施，以避免沉积在可能发生爆炸的管道中。

### 保修

在此销售的产品仅保证在交付给客户时无工艺和材料缺陷。MILTENYI BIOTEC GmbH 对产品是否适用于特定用途不作任何明示或暗示的保证或陈述。对于产品的技术规格以外的内容，不作任何明示或暗示的保证。MILTENYI BIOTEC GmbH 的责任仅限于更换产品或退还货款。MILTENYI BIOTEC GmbH 对产品造成的任何财产损失、人身伤害或经济损失概不负责。

MACS® 是 Miltenyi Biotec GmbH 的注册商标。