

人CD133磁珠-肿瘤组织(92-01-0154)

[组分]

2 mL 人肿瘤组织 CD133 磁珠：与单克隆抗人 CD133 抗体(同型:小鼠 IgG1, 克隆 AC133)偶联的磁珠。

2 mL 人 FcR 阻断试剂：人 IgG。

[规格] 可分选 10^9 个细胞总量，多达 100 次分离。

[保存形式] 人肿瘤组织 CD133 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，请勿冻存。有效期见试剂外标签。

[分选原理]

首先，用人肿瘤组织 CD133 磁珠对 CD133+ 细胞进行磁性标记。然后，将细胞悬液装入分选柱，再将其置于分离器的磁场中。磁性标记的 CD133+ 细胞被保留在柱内，未标记的细胞顺着分选柱流出。从磁场中移除分选柱后，磁性标记的 CD133+ 细胞可作为正选部分被洗脱出来。为了提高纯度，含有 CD133+ 细胞的正选部分必须在第二个分选柱上进行分离。

[背景信息]

CD133 分子是跨膜细胞表面抗原，分子量为 117kDa。CD133 / 1 (克隆 AC133) 抗体识别 CD133 抗原的表位，这个表位被称为表位 1，以区别于 CD133 / 2 (克隆 293C3) 识别的另一个表位(表位 2)。

CD133 在造血干细胞，循环内皮祖细胞和胎儿神经干细胞以及其他组织特异性干细胞（如肾，前列腺和角膜干细胞）上表达。此外，发现 CD133 在多种肿瘤实体（例如胶质母细胞瘤，肺癌，前列腺癌，胰腺癌和肾癌）中的癌干细胞上特异性表达。与表位 CD133 / 1 和 CD133 / 2 共表达的造血系统相反，在大多数分析的肿瘤实体中仅表达 CD133 / 1。因此，使用 CD133 / 1（克隆 AC133）进行细胞分离至关重要。此外，研究还表明，在 CSC 分化过程中，CD133 / 1 表位而非整个 CD133 蛋白表达会消失。

[试剂和仪器要求]

- 缓冲液： 配制含有 pH7.2 PBS、0.5% 牛血清白蛋白（BSA）和 2mMEDTA 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： CD133 阳性细胞可以用 xM、 xL 分选柱富集。对于 CD133 表达水平较低的细胞，建议在富集过程中使用 xL 柱进行最佳回收。强烈表达 CD133 抗原的细胞也可以用 xM、 xL 分选柱去除。
- 组织解离器，全自动组织解离器或带加热模块的全自动组织解离器。
- MACSmix 管旋转器。
- 肿瘤分离试剂盒，人。
- MACS 组织储存液。

- 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) 死细胞清除试剂盒用于死细胞的清除。
- (可选) 预分离过滤器去除细胞团块。

[步骤]

一、样本准备

在处理固体组织时，使用手动方法或解离器和组织解离试剂盒制备单细胞悬液。

▲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。

由于克隆 293C3 和其他克隆的表位与克隆 AC133 的表位在大多数肿瘤组织上并不共表达，因此请勿将其用于细胞分离评估。由于大多数细胞的表达水平较低，因此也不能使用 AC133 荧光素偶联物对已被磁珠标记的细胞进行荧光染色。要通过流式细胞仪或荧光显微镜评估分离效果，可使用与 PE 等偶联的标记检查试剂。

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 μm 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。

▲ 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。

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 60 μL 缓冲液重悬。

4. 每 10^7 个细胞总量加入 20 μL FcR 阻断剂。

5. 每 10^7 个细胞总量添加 20 μL 人肿瘤组织 CD133 磁珠。

6. 混匀，2–8 $^{\circ}\text{C}$ 下使用管旋转器缓慢连续旋转 15 分钟。

7. 每 10^7 个细胞加入 1–2 mL 缓冲液洗涤细胞，300 $\times$ g 离心 10 分钟，去上清。

8. (可选) 添加染色抗体，例如：10 μL PE 标记的检测试剂 2–8 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 5 分钟。

9. 每 10^7 个细胞加入 1–2 mL 缓冲液洗涤细胞，300 $\times$ g 离心 10 分钟，去上清。

10. 用 500 μL 缓冲液重悬最多 10^7 个细胞。

▲ 注：细胞数量增多需相应地增加缓冲液的体积。

11. 进行细胞分选步骤。

三、细胞分选

▲ 根据总细胞数和 CD133+ 细胞数选择合适的分选柱和分离器。

▲ 始终等到分选柱储液器排空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 μ L

xL: 3 mL

3. 将细胞悬液转移至分选柱中。收集流出的未标记细胞。

4. 加适量缓冲液洗脱，待液体全部流尽，再加入适量缓冲液，一共洗 3 次。收集总流出物和第三步流出物混合。

xM: 3×500 μ L

xL: 3×3 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，得到就是标记的细胞。

xM: 1 mL

xL: 5 mL

7. 为了提高 CD133+细胞的纯度，洗脱的部分可以在第二个 xM 或 xL 柱上富集。用新的分选柱重复步骤 1 至 6 中描述的磁分选过程。