

CD34细胞分选试剂盒，人(92-01-0024)

[组分]

10 mL 人 CD34 磁珠：与单克隆小鼠抗人 CD34 抗体偶联的磁珠（同种型：小鼠 IgG1）

10 mL 人 FcR 阻断试剂：人 IgG。

[规格] 可分选 10^{10} 个细胞总量，多达 100 次分离。

[保存形式] CD34 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，请勿冷冻。有效期见试剂外标签。

[分选原理]

首先，用 CD34 磁珠 对 CD34+ 细胞进行磁性标记。然后，将细胞悬浮液装入分选柱，再将其置于分选器的磁场中。磁性标记的 CD34+ 细胞被保留在柱内，未标记的细胞则流出。将分选柱从磁场中移出后，磁性保留的 CD34+ 细胞可作为正选细胞部分被洗脱出来。

[背景信息]

CD34 抗原是一种单链跨膜糖蛋白，表达于人类造血祖细胞、内皮祖细胞、血管内皮细胞、胚胎成纤维细胞以及胎儿和成人神经组织中的某些细胞。

CD34 细胞分选试剂盒含有直接与 CD34 抗体连接的磁珠，用于外周血、脐带血、骨髓、无细胞采血收获物或分化的 ES 和 iPS 细胞中表达 CD34 的细胞进行磁性标记。造血祖细胞在外周血中的占比约为 0.05-0.2%，在脐带血中约为 0.1-0.5%，在骨髓中约为 0.5-3%。

[试剂和仪器要求]

- 缓冲液： 配制含有 pH 7.2 PBS、0.5% 牛血清白蛋白（BSA）和 2 mM EDTA 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：CD34 阳性细胞可以用 xM、xL 分选柱富集。强表达 CD34 的细胞也可以用 xM、xL 分选柱去除。
- (可选) MC CD34 干细胞混合物用于分离细胞的流式细胞术分析。
- (可选) 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

在处理抗凝外周血或白膜层时，应使用密度梯度离心法分离外周血单个核细胞（PBMC）。

▲注：密度梯度分离后除去血小板，将细胞重悬于缓冲液中，在 $200\times g$ 下 20°C 离心 10-15 分钟。小心抽吸上清。重复洗涤步骤。

当处理组织或溶血时，使用标准方法制备单细胞悬浮液。

▲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。

从白细胞提取物中制备细胞

1. 用 30 μm 尼龙网过滤采集的细胞，以去除细胞团块。
2. 用缓冲液洗涤细胞一次，用 300 μL 缓冲液重悬细胞，细胞数不超过 10^8 。进行磁性标记。

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 10^8 个细胞总量。当处理少于 10^8 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 2×10^8 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 10^8 个细胞总量使用 300 μL 缓冲液重悬。
4. 每 10^8 个细胞总量加入 100 μL FcR 阻断剂。
5. 每 10^8 个细胞总量添加 100 μL CD34 磁珠。

6. 混匀，2-8 °C 下孵育 30 分钟。
 7. (可选) 添加染色抗体，并在 2-8 °C 避光孵育 5 分钟。
 8. 每 10^8 个细胞加入 5 - 10 mL 缓冲液洗涤细胞， $300\times g$ 离心 10 分钟，去上清。
 9. 用 500 μ L 缓冲液重悬最多 10^8 个细胞。
- ▲ 注：细胞数量增多需相应地增加缓冲液的体积。
10. 进行细胞分选步骤。

三、细胞分选

- ▲ 根据总细胞数和 CD34+ 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: $3\times 500\mu\text{L}$ xL: $3\times 3\text{ mL}$
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



FOCUS ON CELL THERAPY

7. 为了提高 CD34+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。