

CD326 (EpCAM) 磁珠, 小鼠(92-01-0169)

[组分]

小鼠 CD326 (EpCAM) 磁珠: 与抗小鼠 CD326 (EpCAM) 单克隆抗体 (同型: 大鼠 IgG1) 偶联的磁珠。

[规格] 2 mL, 可分选 2×10^9 个细胞总量, 多达 200 次分离。

[保存形式] CD326 (EpCAM) 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 CD326 (EpCAM)磁珠对 CD326 (EpCAM)+细胞进行磁性标记。然后, 将细胞悬浮液装载到分选柱上, 该分选柱置于分选器的磁场中。磁性标记的 CD326 (EpCAM)+细胞保留在柱内, 未标记的细胞则流出。将分选柱移出磁场后, 磁性保留的 CD326 (EpCAM)+细胞可以作为阳选的细胞部分被洗脱。为了提高纯度, 含有 CD326 (EpCAM)+细胞的阳选部分必须在第二个分选柱上分选。

[背景信息]

CD326 (EpCAM) 是一种 40 kDa 跨膜糖蛋白, 参与细胞粘附、细胞增殖和肿瘤进展。它是一种同型的钙非? 依赖性细胞粘附分子。EpCAM 广泛表达于上皮细胞, 包括内胚层细胞、角质形成细胞、未成熟胸腺细胞、朗格汉斯细胞、淋巴结树突状细胞、胸腺树突状细胞、脾树突状细胞, 以及包括几

乎所有癌症在内的肿瘤细胞。此外，EpCAM 在小鼠胚胎干细胞上也有表达，并被描述为鉴定成功重编程的诱导多能干细胞（iPS）的标记。

[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 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,例如小鼠血清白蛋白、小鼠血清或胎牛血清。不建议使用含有 Ca^{2+} 或 Mg^{2+} 的缓冲液或培养基。
- 分选柱和分选器： CD326 (EpCAM)阳性细胞可以用 xL 分选柱富集。
- (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。
- (可选) 滤网 (30 μm)
- (可选) 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。
- (可选) 肿瘤分离试剂盒, 小鼠
- (可选) CD45 分选磁珠, 小鼠

[步骤]

一、样本准备

当处理淋巴器官、非淋巴组织或外周血时，使用组织解离器制备单细胞悬液。

CD326 (EpCAM)除了存在于上皮细胞、肿瘤细胞和胚胎干细胞外，还表达于白细胞亚型。因此，在从离体的原始组织中分离上皮细胞或肿瘤细胞时，必须使用小鼠 CD45 分选磁珠等方法去除这些细胞。

CD45 阳性细胞的去除

1. 用 90 μL 缓冲液重悬细胞。
2. 加入 10 μL CD45 磁珠。
3. 混匀并在冰箱中孵育 15 分钟 (2-8 $^{\circ}\text{C}$) 。
4. 每 10^7 个细胞加入 1mL 缓冲液清洗细胞，然后 300 \times g 离心 5 分钟。完全吸取上清液。
5. 将 xL 柱放入合适的分选器并置于磁场中。
6. 用 3mL 缓冲液冲洗分选柱。
7. 用 500 μL 缓冲液重悬细胞，并将细胞悬浮液转移至分选柱中。
8. 收集通过的未标记细胞。用 3mL 缓冲液冲洗三次。
9. 收集总流出物；这是 CD45⁻ 部分。
10. (可选，如果需要 CD45⁺ 细胞) 将分选柱从分选器中取出，放在合适的收集管中。将 5 毫升缓冲液移到分选柱上。用力将活塞推入分选柱，立即冲出磁性标记的细胞。
11. 继续富集 CD326 (EpCAM)⁺ 细胞。

▲ 死细胞可能与磁珠非特异性结合。要去除死细胞，建议使用密度梯度离心法或死细胞去除试剂盒。

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，使用与指示相同的试剂体积。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 $30 \mu\text{m}$ 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 $90 \mu\text{L}$ 缓冲液重悬。

4. 每 10^7 个细胞总量添加 $10 \mu\text{L}$ CD326 (EpCAM)磁珠。

5. 混匀， $2-8^\circ\text{C}$ 孵育 15 分钟。

6. (可选) 根据说明书推荐，添加染色抗体。

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. 用 $500 \mu\text{L}$ 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。

9. 进行细胞分选步骤。

三、细胞分选

▲ 根据总细胞数和 CD326 (EpCAM)+细胞数选择合适的分选柱和分选器。

▲ 始终等到分选柱储液器排空后再进行下一步操作。

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 3 mL 的缓冲液润洗分选柱。
3. 将细胞悬液转移至分选柱中。收集包含未标记细胞的流出液。
4. 加 3 mL 的缓冲液洗脱，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。
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. 加入 5 mL 的缓冲液到分选柱中，迅速用塞子推下，得到就是磁性标记的细胞。
7. （可选）为了提高 CD326 (EpCAM)+细胞的纯度，洗脱的部分可以在第二个 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。