

人CD56磁珠分选试剂(51-01-0005)

[组分]

人 **CD56 磁珠**：与单克隆抗人 CD56 抗体偶联的磁珠（同种型：小鼠 IgG1）。

[规格] 2 mL，可分选 10^9 个细胞总量，多达 100 次分离。

[保存形式] CD56 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 CD56 磁珠对 CD56+ 细胞进行磁性标记。然后，将细胞悬浮液装入置于分选器磁场的分选柱中。磁性标记的 CD56+ 细胞被保留在柱中，未标记的细胞顺着分选柱流出。将柱从磁场中移出后，磁性保留的 CD56+ 细胞可作为正选细胞部分被洗脱出来。

[背景信息]

CD56 磁珠是根据 CD56 抗原的表达而开发的，用于分离人源细胞。基本上所有人 NK 细胞都表达 CD56，激活后细胞膜上的 CD56 密度会增加。该抗原还存在于 CD3+ T 细胞的一个独特亚群中，该亚群可介导非 MHC 限制性细胞毒性，还存在于肌母细胞、某些神经组织和肿瘤中。

[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。
- 分选柱和分选器： CD56 阳性细胞可以用 xM、 xL 分选柱富集。强烈表达 CD56 抗原的细胞也可以用 xM、 xL 分选柱去除。
- (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:在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。

当处理组织时，使用组织解离器制备单细胞悬浮液。

▲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。

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 $80\mu\text{L}$ 缓冲液重悬。

4. 每 10^7 个细胞总量添加 $20\mu\text{L}$ CD56 磁珠。

5. 混匀， $2-8^\circ\text{C}$ 孵育 15 分钟。

6. 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。

7. 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。

8. 进行细胞分选步骤。

三、细胞分选

▲ 根据总细胞数和 CD56+ 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。

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，得到就是磁性标记的细胞。

xM: 1 mL

xL: 5 mL