

## CD44分选磁珠，人(92-01-0114)

### [组分]

人 CD44 磁珠：与单克隆抗人 CD44 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] CD44 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。

交叉反应：经测试，CD44 抗体可与恒河猴 (*Macaca mulatta*) 和猕猴 (*Macaca fascicularis*) 细胞发生反应。

### [分选原理]

首先，用 CD44 磁珠对 CD44+ 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 CD44+ 细胞被保留在柱中，未标记的细胞顺着分选柱流出。将分选柱从磁场中移出后，磁性保留的 CD44+ 细胞可作为正选细胞部分被洗脱出来。为了提高纯度，含有 CD44+ 细胞的阳选的部分必须在第二个分选柱上分离。

### [背景信息]

CD44 抗体与大约 85-95 kDa 的细胞表面糖蛋白 CD44（又称 IN、LHR、MC56、ECMR-III）发生反应。它是透明质酸（HA）的受体，通过对 HA 的亲合力以及可能对骨桥蛋白、胶原和基质金属蛋白酶（MMPs）等其他配体的亲合力，介导细胞-细胞和细胞-基质之间的相互作用。单克隆 CD44 抗

体可识别人类和恒河猴 (*Macaca mulatta*) 的 CD44 抗原。在人体内, CD44 在造血细胞、成纤维细胞和神经胶质细胞等中胚层细胞上强烈表达。此外, 在几种癌症和癌细胞系中也观察到了 CD44 的表达。在这里, 它在癌细胞迁移和基质粘附中发挥作用, 对细胞微环境做出反应, 从而促进细胞聚集和肿瘤细胞生长。此外, CD44 还被确定为癌症干细胞 (CSC) 的标记物, 包括具有较高致瘤性和转移潜能的乳腺癌干细胞、结直肠癌干细胞、胰腺癌干细胞和前列腺癌干细胞。

### [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。
- ▲ 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: CD44 阳性细胞可以用 xM、xL 分选柱富集。强烈表达 CD44 抗原的细胞也可以用 xM、xL 分选柱去除。
- (可选) 荧光偶联的 CD44 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  $20^{\circ}\text{C}$  离心 10-15 分钟。

小心抽吸上清。重复洗涤步骤。

当处理溶血时，使用标准方法制备单细胞悬浮液。

当处理组织时，使用组织解离器制备单细胞悬液。

▲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。

## 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  $2\times 10^7$  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。

▲ 注：为了防止非特异性结合，请根据说明书添加 FcR 阻断试剂。

4. 每  $10^7$  个细胞总量添加 20  $\mu\text{L}$  CD44 磁珠。

5. 混匀，2-8 °C 孵育 15 分钟。

6. (可选) 添加染色抗体，例如：10  $\mu\text{L}$  CD44-PE 2-8 °C 避光孵育 5 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. 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

▲ 这个产品不适合用 xM 分选柱进行细胞分选。

▲ 根据总细胞数和 CD44+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 CD44+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。