

CD90分选磁珠，人(92-01-0129)

[组分]

人 CD90 磁珠：与单克隆抗人 CD90 抗体偶联的磁珠（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] CD90 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 CD90 磁珠对 CD90+ 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 CD90+ 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 CD90+ 细胞可作为正选细胞部分被洗脱出来。为了提高纯度，含有 CD90 +细胞的阳选细胞部分可以在第二个柱上分离。

[背景信息]

CD90 抗体能与人类 CD90 抗原反应，也称为 Thy-1。Thy-1 是一种 25-35 kD GPI 锚定蛋白，属于 Ig 超家族，参与细胞-细胞和细胞-基质的相互作用。CD90 被确定为人类肝癌中癌症干细胞的标记物。除癌症干细胞外，它还表达于胚胎干细胞（ESC）、诱导多能干细胞（iPSC）、神经元、人类胎儿肝细胞和胸腺细胞的小亚群、脐带血和骨髓细胞。CD90 还在 CD34+ 原始造血干细胞亚群中

表达。CD90+CD34+ 细胞是高增殖潜能集落形成细胞 (HPP-CFC) 的特征。此外,间充质干细胞 (MSCs) 也表达 CD90。

[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: CD90 阳性细胞可以用 xM、xL 分选柱富集。强烈表达 CD90 抗原的细胞也可以用 xM、xL 分选柱去除。
- (可选) 荧光偶联的 CD90 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 $30\text{ }\mu\text{m}$ 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 $80\text{ }\mu\text{L}$ 缓冲液重悬。
4. 每 10^7 个细胞总量添加 $20\text{ }\mu\text{L}$ CD90 磁珠。
5. 混匀, $2-8^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 分钟。

6. (可选) 添加染色抗体, 例如: 10 μ L CD90-PE 2-8 $^{\circ}$ 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 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。
9. 进行细胞分选步骤。

三、细胞分选

- ▲ 根据总细胞数和 CD90+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 $\times$ 500 μ L xL: 3 $\times$ 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



FOCUS ON CELL THERAPY

7. (可选)为了提高 CD90+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。