

CD34细胞超纯分选试剂盒，人(92-01-0151)

[组分]

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

2 mL 人 FcR 阻断试剂：人 IgG。

[规格] 可分选 2×10^9 个细胞总量，多达 20 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 超纯磁珠 对 CD34+ 细胞进行磁性标记。然后，将细胞悬浮液装入分选柱，该分选柱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 是人造血干/祖细胞的公认标志物，并且还在血管细胞，内皮祖细胞和成熟内皮细胞上表达。

CD34 超纯分选试剂盒含有直接与 CD34 抗体结合的磁珠，用于外周血，脐带血，骨髓或白细胞单采术样本中 CD34 细胞的分选。造血祖细胞在外周血单核细胞（PBMC）中的含量为 0.05-0.2%，在脐带血单个核细胞（MNC）中为 0.1-0.5%或在骨髓 MNC 中为 0.5-3%，这些都可以被快速有效地富集。



CD34 超纯分选试剂盒适用于所有常规 CD34⁺ 细胞分离。此外，其独特的配方为富含碎片的样品提供了特别的优势。

[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。
- 分选柱和分选器： 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: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 $30\ \mu\text{m}$ 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 $300\ \mu\text{L}$ 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 2×10^8 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 $30\ \mu\text{m}$ 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 10^8 个细胞总量使用 $300\ \mu\text{L}$ 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 超纯磁珠。
 6. 混匀，2–8 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 30 分钟。
 7. (可选) 添加染色抗体，并在 2–8 $^{\circ}\text{C}$ 下避光孵育 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 μL 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 μL 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

7. （可选）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。