

CD117分选磁珠试剂盒，人(92-01-0071)

[组分]

2 mL 人 CD117 磁珠：与单克隆抗人 CD117 抗体偶联的磁珠（同种型：小鼠 IgG1）。

2 mL 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] 所有试剂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 CD117 磁珠对 CD117+ 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 CD117+ 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 CD117+ 细胞可作为正选细胞部分被洗脱出来。

[背景信息]

CD117 分选磁珠试剂盒是根据 CD117 抗原的表达情况开发的，用于分选人源细胞。CD117（也称为 c-kit 或干细胞生长因子受体）是一种 145 kDa 的细胞表面糖蛋白，具有酪氨酸激酶活性。该分子被认为参与细胞的信号传导、活化和增殖。1-3% 的动员后外周血单个核细胞和脐血细胞以及高达 10% 的骨髓细胞表达 CD117。大约 25% 的 CD117+ 细胞表达 CD133 和 CD34。CD117 还表达于嗜碱性粒细胞、髓样树突状细胞、TCR $\alpha\beta$ + T 细胞、CD19+ Pro-B 细胞和 CD56+ NK 细胞，以及肥大细胞、



黑色素细胞和 AML（急性髓性白血病）血块。偶联了磁珠的 CD117 抗体（克隆 AC126）不会干扰其与干细胞因子（SCF）的结合。

[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：CD117 阳性细胞可以用 xM、xL 分选柱富集。
- (可选) 荧光偶联的 CD117 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

1. 将细胞通过 30 μm 尼龙网或预分离过滤器,以去除细胞团块。用缓冲液洗涤细胞一次,然后每 10^8 个细胞用 300 μL 缓冲液的最终体积重悬细胞团。如果细胞总数少于 10^8 个,则使用 300 μL 。进行磁性标记。

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。

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 $30\text{ }\mu\text{m}$ 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 10^8 个细胞总量使用 $300\text{ }\mu\text{L}$ 缓冲液重悬。
4. 每 10^8 个细胞总量添加 $100\text{ }\mu\text{L}$ FcR 阻断试剂。
5. 每 10^8 个细胞总量添加 $100\text{ }\mu\text{L}$ CD117 磁珠。

6. 混匀，2-8 °C 孵育 15 分钟。
7. (可选) 添加染色抗体，例如：10 μ L CD117 (A3C6E2) -PE 2-8 °C 避光孵育 5 分钟。
▲ 注意：不建议使用识别与克隆 AC126 类似的 CD117 表位的 CD117 抗体，如 104D2。
8. 每 10^8 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。
9. 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。
10. 进行细胞分选步骤。

三、细胞分选

- ▲ 根据总细胞数和 CD117+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。收集包含未标记细胞的流出液。
4. 结合磁珠的细胞会被吸附到分选柱上，没有结合的细胞会顺着液体流下来。加适量的缓冲液，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 3 步的流出液混合。
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。



FOCUS ON CELL THERAPY

xM: 1 mL

xL: 5 mL

7. (可选)为了提高 CD117+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。