



CD34分选试剂盒，人（间接分选）（92-01-0290）

[组分]

2 mL CD34 半抗原抗体：单克隆 CD34 抗体偶联的半抗原（同种型：小鼠 IgG1）。

2 mL 抗半抗原磁珠：与半抗原抗体偶联的磁珠。

2 mL 人 FcR 阻断试剂：人 IgG。

[规格] 可分选 2×10^9 个细胞总量。

[保存形式] 所有组分均储存在含有稳定剂和 0.05% 叠氮化钠的缓冲液中。

[储存条件] $2-8^{\circ}\text{C}$ 避光保存，请勿冷冻。有效期见试剂外标签。

[分选原理]

首先，CD34+细胞会被间接磁性标记，使用的是结合了半抗原的单克隆 CD34 抗体和半抗原磁珠。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。未标记的细胞则流过分选柱。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]

间接 CD34 分选试剂盒是一种间接磁性标记系统，用于 CD34 表达细胞的阳性分选，从外周血、脐带血、骨髓或无细胞采血中分离造血祖细胞。使用间接 CD34 磁珠分选试剂盒，可以快速有效地富

集造血祖细胞，这些细胞在外周血中的占比约为 0.05-0.2%，在脐带血中约为 0.1-0.5%，在骨髓中约为 0.5-3%。

[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。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。
- (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) 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。

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 400 μL 缓冲液重悬。
4. 每 10^8 个细胞总量加入 100 μL FcR 阻断试剂，混匀。
5. 每 10^8 个细胞总量添加 100 μL CD34 半抗原抗体。
6. 混匀， $2-8\ ^\circ\text{C}$ 下孵育 15 分钟。
7. 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。
8. 用 400 μL 缓冲液重悬最多 10^8 个细胞。
9. 每 10^8 个细胞加入 100 μL 半抗原磁珠。

10. 混匀并在冰箱（2-8 °C）中孵育 15 分钟。
 11. （可选）加入染色抗体，如 10 μL CD34-FITC、CD34-PE 或 CD34-APC，在冰箱（2-8 °C）中避光孵育 5 分钟。
 12. 每 10⁸ 个细胞加入 1-2 mL 缓冲液清洗细胞，然后 300×g 离心 10 分钟。去除上清液。
 13. 用 500 μL 缓冲液重悬最多 10⁸ 个细胞。
- ▲ 注：细胞数量增多需相应地增加缓冲液的体积。
14. 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。

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。
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，这是未标记的细胞。
xM: 3×500 μL 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，得到就是标记的细胞。
xM: 1 mL xL: 5 mL



FOCUS ON CELL THERAPY

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。