

CD24分选磁珠试剂盒，人(92-01-0295)

[组分]

1 mL 人 CD24 生物素：单克隆 CD24 抗体（克隆号：32D12；同型：小鼠 IgG1）偶联的生物素。

2 mL 抗生物素磁珠：与单克隆抗生物素抗体(同种型:小鼠 IgG1)偶联的磁珠。

[规格] 可分选 10^9 个细胞总量，多达 100 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，请勿冷冻。有效期见试剂外标签。

[分选原理]

首先，用 CD24 生物素抗体和抗生物素磁珠对 CD24+ 细胞进行间接磁性标记。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 CD24+ 细胞被保留在柱内，未标记的细胞则流出。从磁场中移除分选柱后，磁性保留的 CD24+ 细胞可作为正选细胞部分被洗脱出来。为了提高纯度，含有 CD24+ 细胞的正选细胞部分必须在第二个分选柱上进行分离。

[背景信息]

CD24 分选磁珠试剂盒是为去除表达人 CD24 抗原的细胞而开发的。人 CD24 抗原又称分化簇 24 或热稳定抗原（HSA）。编码的硅糖蛋白通过糖基磷脂酰肌醇（GPI）连接到细胞表面，发挥细胞粘附分子的功能。CD24 是乳腺癌干细胞的阴性标记物和卵巢癌干细胞的阳性标记物。

[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。
- ▲ 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：CD24 阳性细胞可以用 xM、xL 分选柱富集。强烈表达 CD24 抗原的细胞也可以用 xM、xL 分选柱去除。
- (可选) CD44 磁珠。
- (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。
- (可选) 组织解离器

[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×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。

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 2×10^7 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 $40\ \mu\text{L}$ 缓冲液重悬。

4. 每 10^7 个细胞加入 $10\ \mu\text{L}$ CD24 生物素。

5. 混匀，并在冰箱 ($2-8\ ^\circ\text{C}$) 中孵育 15 分钟。

6. 每 10^7 个细胞加入 $0.5-1\ \text{mL}$ 缓冲液清洗细胞，然后 $300 \times g$ 离心 10 分钟。完全去除上清液。

7. 每 10^7 个细胞用 $80\ \mu\text{L}$ 缓冲液重悬细胞颗粒。

8. 每 10^7 细胞加入 20 μL 抗生物素磁珠。
9. 混匀，并在冰箱中孵育 15 分钟（2-8 $^{\circ}\text{C}$ ）。
10. (可选) 加入染色抗体，如 10 μL CD24-PE，在冰箱（2-8 $^{\circ}\text{C}$ ）中暗处孵育 5 分钟。
11. (可选) 每 10^7 个细胞加入 1-2 mL 缓冲液洗涤细胞，然后 $300\times g$ 离心 10 分钟。完全去除上清液。

▲ 注：细胞数量增多需相应地增加缓冲液的体积。

12. 进行细胞分选步骤。

三、细胞分选

▲ 根据总细胞数和 CD24+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。收集包含未标记细胞的流出液。
4. 加合适体积的缓冲液洗脱，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。

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，得到就是磁性标记的细胞。



FOCUS ON CELL THERAPY

xM: 1 mL

xL: 5 mL

7. (可选)为了提高 CD24⁺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。