

## LGR5分选磁珠，人(92-01-0297)

### [组分]

人 LGR5 磁珠：与单克隆抗人 LGR5 抗体偶联的磁珠（大鼠 IgG2b）。

[规格] 2 mL，可分选  $10^9$  个细胞总量，多达 100 次分离。

[保存形式] LGR5 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，用抗 LGR5 磁珠对 LGR5+ 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 LGR5+ 细胞被保留在柱内，未标记的细胞则流过。从磁场中移除分选柱后，磁性保留的 LGR5+ 细胞可作为正选细胞部分被洗脱出来。

### [背景信息]

LGR5 与 Wnt 受体结合并充当 R-spondin 受体，从而在正常干细胞和肿瘤干细胞的 Wnt/ $\beta$ -连环蛋白信号调节中发挥核心作用。LGR5 阳性细胞最初被描述为小肠、结肠、毛囊、胃和肾脏发育过程中干细胞的高度特异性标记物。研究表明，LGR5+ 隐窝干细胞是肠癌的起源细胞，根据 LGR5 的表达可以识别和分离人类结直肠癌中的 CSC。

## [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  $\text{Ca}^{2+}$  或  $\text{Mg}^{2+}$  的缓冲液或培养基。
- 分选柱和分选器： LGR5 阳性细胞可以用 xM、xL 分选柱富集。由于大多数细胞的 LGR5 表达水平较低，建议在富集过程中使用 xL 柱进行最佳回收。
- (可选) 荧光偶联的 CD44 抗体用于流式分析。
- FcR 阻断试剂，人
- (可选) PI 或 7-AAD 可以用于流式分析中排除死细胞。
- (可选) 组织解离器，全自动组织解离器或带加热模块的全自动组织解离器。
- (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  $20^{\circ}\text{C}$  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  $2 \times 10^7$  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  $70 \mu\text{L}$  缓冲液重悬。

4. 每  $10^7$  个细胞总量添加  $10 \mu\text{L}$  人 FcR 阻断试剂

5. 每  $10^7$  个细胞总量添加  $20 \mu\text{L}$  LGR5 磁珠。

6. 混匀， $2-8^\circ\text{C}$  避光孵育 15 分钟。

7. 每  $10^7$  个细胞加入  $1-2 \text{ mL}$  缓冲液洗涤细胞， $300 \times g$  离心 10 分钟，去上清。

8. (可选) 添加染色抗体，例如：10  $\mu$ L PE 标记检测试剂 2-8  $^{\circ}$ C 避光孵育 5 分钟。

9. 用 500  $\mu$ L 缓冲液重悬最多  $4 \times 10^7$  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 LGR5+ 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。

#### 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 3 mL 的缓冲液润洗分选柱。

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 3 mL 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。

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. 加入 5 mL 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。