

ErbB-2分选磁珠，人(92-01-0298)

[组分]

人 ErbB-2 磁珠：与单克隆抗人 ErbB-2(HER-2/neu) 抗体偶联的磁珠（同种型：小鼠 IgG1）。

[规格] 2 mL，可分选 10^9 个细胞总量。

[保存形式] ErbB-2 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 ErbB-2 磁珠对 ErbB-2+ 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 ErbB-2+ 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 ErbB-2+ 细胞可作为正选细胞部分被洗脱出来。

[背景信息]

ErbB-2 抗原又称 HER-2/neu，属于人类上皮生长因子受体家族。它是一种 185 kD 跨膜糖蛋白受体，具有酪氨酸激酶活性。ErbB-2 在 25-30% 的人类乳腺癌以及其他各种肿瘤（如卵巢癌、前列腺癌、肺癌、结直肠癌、胰腺癌或胃癌）中过度表达。在正常组织和各种癌细胞系中都检测到了 ErbB-2 蛋白。

抗 ErbB-2 磁珠可用于从外周血或造血组织中富集表达 ErbB-2 的播散性上皮肿瘤细胞。富集的 ErbB-2+ 肿瘤细胞可进行表型或基因型鉴定，或直接进行培养。

[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： ErbB-2 阳性细胞可以用 xM 分选柱富集。
- FcR 阻断试剂
- (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 20°C 下 200×g 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 10^7 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. 加入 10-20 倍标记体积的缓冲液清洗细胞，然后在 $300 \times g$ 转速下离心 10 分钟。

2. 完全去除上清液。

3. 以 5×10^7 细胞总数起始。用 $300 \mu\text{L}$ 缓冲液重悬细胞颗粒。

4. 每 5×10^7 细胞总量加入 $100 \mu\text{L}$ FcR 阻断剂，以阻断 ErbB-2 磁珠的非特异性结合。

▲ 注：要阻断 FcR 介导的非特异性标记非上皮细胞，强烈建议使用 FcR 阻断试剂。

5. 每 5×10^7 细胞总量加入 $100 \mu\text{L}$ ErbB-2 磁珠，最终标记体积为每 5×10^7 细胞总量 $500 \mu\text{L}$ 。

6. 混匀并在冰箱中孵育 30 分钟 ($2-8^\circ$)。

7. 加入 10-20 倍的标记体积的缓冲液清洗细胞， $300 \times g$ 离心 10 分钟。

8. 完全去除上清液

9. 用 $500 \mu\text{L}$ 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 ErbB-2+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 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 500 μL 的缓冲液润洗分选柱。
3. 将 500-1000 μL 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 \times 500 μL 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 1 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。
7. (可选)为了提高 ErbB-2+细胞的纯度，洗脱的部分可以在第二个 xM 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。