

钻石级CD34细胞分选试剂盒，人(92-01-0289)

[组分]

2 mL 钻石级生物素标记的 Lin 抗体混合物，人：生物素标记单克隆抗人 CD2、CD3、CD11b、CD14、CD15、CD16、CD19、CD56、CD61 和 CD235a(糖蛋白 A)的抗体混合物。

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

2 mL 钻石级 CD34 磁珠，人：与单克隆 CD34 抗体偶联的磁珠（同种型：小鼠 IgG1）。

[规格] 可分选 2×10^9 个细胞总量，多达 40 次分离。

[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 °C 避光保存，请勿冷冻。有效期见试剂外标签。

[分选原理]

人钻石级 CD34 分选试剂盒是专为从外周血单个核细胞（PBMC）和骨髓单核细胞（BM MNC）中分离纯度极高的 CD34⁺ 干细胞而开发的。预期纯度几乎达到 100%。干细胞的分选分两步进行。首先，用抗谱系特异性抗原的生物素结合抗体混合物和抗生物素磁粒间接磁性标记 Lin⁺ 细胞。随后将细胞放入分选柱中进行磁性分离，磁性标记的 Lin⁺ 细胞被保留在柱中，而未标记的 Lin⁻ 细胞则通过柱流出。第二步，用 钻石级 CD34 磁珠直接标记富集的干细胞部分。在随后的磁性分离过程中，从磁场中移除分选柱后，CD34⁺ 干细胞被洗脱出来。为了达到最高纯度，含有干细胞的正选细胞部分可在第二个分选柱上分离。



[背景信息]

CD34 抗原是一种单链跨膜糖蛋白，在人类造血干细胞和祖细胞、内皮祖细胞以及一些谱系阳性细胞上都有表达。钻石 CD34 分选试剂盒 (人) 结合了谱系去除和 CD34 富集，可获得纯净的 Lin-CD34⁺ 干细胞，例如用于表达谱分析。使用钻石级 CD34 分选试剂盒，即使起始比例较低，也能从 BM MNCs 或 PBMCs 中分选出人原始 CD34 细胞。

[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。
- (可选) MC CD34 干细胞混合物用于流式细胞术分析分离结果。
- (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。

二、Lin⁺细胞的磁珠标记

▲ 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 5×10^7 个细胞总量。当处理少于 5×10^7 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 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. $200\times g$ 离心 10 分钟。去除上清。

3. 每 5×10^7 个细胞总量使用 $200\text{ }\mu\text{L}$ 缓冲液重悬。

4. 每 5×10^7 细胞总量加入 $50\text{ }\mu\text{L}$ 钻石级生物素标记的 Lin 抗体混合物。

5. 混匀并在冰箱 ($2-8^{\circ}\text{C}$) 中孵育 10 分钟。

6. 每 5×10^7 细胞加入 $2.5-5\text{ mL}$ 缓冲液清洗细胞，然后 $300\times g$ 离心 10 分钟。完全去除清液。

7. 每 5×10^7 个细胞用 $400\text{ }\mu\text{L}$ 缓冲液重悬细胞颗粒。

8. 每 5×10^7 细胞总量加入 100 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. 每 5×10^7 个细胞加入 5-10 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。
 11. 用 1000 μL 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。
12. 进行细胞分选步骤。

三、细胞分选：Lin⁺细胞的去除

▲ 始终等到分选柱储液器排空后再进行下一步操作。

使用 LD 分选柱进行去除

1. 将 LD 分选柱放入合适的分选器的磁场中。
2. 用 2 mL 缓冲液冲洗分选柱。
3. 将细胞悬浮液转移至分选柱中。
4. 收集通过的未标记细胞，用 $2 \times 1 \text{ mL}$ 缓冲液冲洗分选柱。收集总流出液；这是未标记的 Lin⁻细胞部分。通过添加两次缓冲液来执行洗涤步骤。只有当分选柱储液器排空后再加入新的缓冲液。
5. 继续进一步富集 CD34⁺ 干细胞。

四、CD34⁺干细胞的磁珠标记

▲ 下面给出的磁性标记体积适用于初始细胞数不超过 5×10^7 的细胞。如果初始细胞数较多，可相应增加试剂体积。

1. $300 \times g$ 离心 10 分钟。去除上清。
2. 每 5×10^7 个细胞总量使用 200 μL 缓冲液重悬。
3. 每 5×10^7 个细胞总量添加 50 μL 钻石级 CD34 磁珠。
4. 混匀，2-8 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 分钟。
5. (可选) 添加染色抗体，例如：25 μL CD34-FITC 或 CD45-APC 2-8 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 10 分钟。
6. 每 5×10^7 个细胞加入 2.5 - 5 mL 缓冲液洗涤细胞， $300 \times g$ 离心 10 分钟，去上清。
7. 用 500 μL 缓冲液重悬最多 10^8 个细胞。

五、细胞分选：CD34+干细胞的阳性分选

xM 分选柱进行细胞分选

▲ 为达到最高纯度，请进行两次连续的分选柱分选。

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 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。



▲ 注：若要进行第二次分选柱分选，可将细胞直接从第一个分选柱洗脱到第二个润湿的分选柱上，而不用收集管。

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. 为了提高 CD34⁺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。