

## 人CD34磁珠分选试剂(51-01-0003)

### [组分]

**2 mL 人 CD34 磁珠：**与单克隆小鼠抗人 CD34 抗体偶联的磁珠（同种型：小鼠 IgG1）。

**2 mL 人 FcR 阻断试剂：**人 IgG。

**[规格]**可分选  $2 \times 10^9$  个细胞总量，多达 20 次分离。

**[保存形式]** CD34 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 CD34 磁珠 对 CD34+ 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 CD34+ 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 CD34+ 细胞可作为正选细胞部分被洗脱出来。

### [背景信息]

CD34 抗原是一种单链跨膜糖蛋白，表达于人类造血祖细胞、内皮祖细胞、血管内皮细胞、胚胎成纤维细胞以及胎儿和成人神经组织中的某些细胞。

CD34 细胞分选试剂盒含有直接与 CD34 抗体连接的磁珠，用于外周血、脐带血、骨髓、无细胞采血收获物或分化的 ES 和 iPS 细胞中表达 CD34 的细胞进行磁性标记。造血祖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 2mMEDTA 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  $\text{Ca}^{2+}$  或  $\text{Mg}^{2+}$  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。强表达 CD34 的细胞也可以用 xM、xL 分选柱去除。
- (可选) MC CD34 干细胞混合物用于分离细胞的流式细胞术分析。
- (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。

## [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。

### 从白细胞提取物中制备细胞

1. 用 30  $\mu\text{m}$  尼龙网过滤采集的细胞，以去除细胞团块。
2. 用缓冲液洗涤细胞一次，用 300  $\mu\text{L}$  缓冲液重悬细胞，细胞数不超过  $10^8$ 。进行磁性标记。

## 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  $2 \times 10^8$  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 300  $\mu\text{L}$  缓冲液重悬。
4. 每  $10^8$  个细胞总量加入 100  $\mu\text{L}$  FcR 阻断剂。
5. 每  $10^8$  个细胞总量添加 100  $\mu\text{L}$  CD34 磁珠。
6. 混匀，2—8  $^{\circ}\text{C}$  下孵育 30 分钟。

7. (可选) 添加染色抗体, 并在 2—8 °C 避光孵育 5 分钟。
8. 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。
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 CD34+ 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  $\mu\text{L}$ xL: 3 mL
3. 将细胞悬液转移至分选柱中。收集流出的未标记细胞。
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, 得到就是标记的细胞。

xM: 1 mLxL: 5 mL

7. 为了提高 CD34<sup>+</sup>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。