

CD31分选磁珠，小鼠(92-01-0143)

[组分]

CD31 磁珠，小鼠：与单克隆抗小鼠 CD31 抗体偶联的磁珠（同种型：大鼠 IgG2a）。

[规格] 2 mL，可分选 2×10^9 个细胞总量，多达 200 次分离。

[保存形式] CD31 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 CD31 磁珠对 CD31+ 细胞进行磁性标记。然后，将细胞悬浮液装入置于分选器磁场的分选柱中。磁性标记的 CD31+ 细胞被保留在柱中，未标记的细胞顺着分选柱流出。将柱从磁场中移出后，磁性保留的 CD31+ 细胞可作为正选细胞部分被洗脱出来。

[背景信息]

CD31 抗体与细胞表面蛋白 CD31 反应。鼠 CD31 抗原也称为 PECAM-1。CD31 是单通 I 型膜蛋白，含有 6 个 Ig 样 C2 型结构域，并作为细胞粘附分子起作用。它存在于成熟的内皮细胞以及大多数白细胞亚型和血小板上，其中表达水平可以变化。除了其在细胞粘附中的功能外，在大多数炎症条件下，蛋白质为白细胞跨内皮迁移（TEM）所必需。

[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。始终使用新鲜制备的缓冲液。
- ▲ 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,例如小鼠血清白蛋白、小鼠血清或胎牛血清。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： CD31 阳性细胞可以用 xM、xL 分选柱富集。强烈表达 CD31 抗原的细胞也可以用 xM、xL 分选柱去除。
- ▲ 注意：对于弱表达细胞，建议使用 LS 柱，以便在富集过程中获得最佳回收率。
- (可选) 荧光偶联的 CD31 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

在处理淋巴器官、非淋巴组织或外周血时，使用手动方法或组织解离器制备单细胞悬液。

当处理原代组织时，使用手动方法或组织解离器制备单细胞悬液。

- ▲ 注意：由于 CD31 表位会被胰蛋白酶降解，因此在组织解离或培养细胞脱离时不应使用该酶。

▲ 除了在内皮细胞上存在外，CD31 在大多数白细胞亚型和血小板上都有不同程度的表达。

因此，当内皮细胞应从分离的原代组织中分离时，必须事先去除这些细胞，例如通过使用 CD45 磁珠，小鼠。

▲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 $90 \mu\text{L}$ 缓冲液重悬。

4. 每 10^7 个细胞总量添加 $10 \mu\text{L}$ CD31 磁珠。

5. 混匀， $2-8^\circ\text{C}$ 孵育 15 分钟。

6. (可选) 添加染色抗体，例如： $10 \mu\text{L}$ CD31-PE $2-8^\circ\text{C}$ 避光孵育 5 分钟。

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

8. 用 500 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。

9. 进行细胞分选步骤。

三、细胞分选

▲ 根据总细胞数和 CD31+ 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。收集含有未标记细胞的流出液。

4. 加适量的缓冲液，收集总流出物，并与步骤 3 中的流出液混合，这是未标记的细胞。

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。

xM: 1 mL

xL: 5 mL

7. (可选) 为了提高 CD31+ 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。