

CD271分选磁珠试剂盒，人(92-01-0150)

[组分]

2 mL 人 CD271 **磁珠**：与单克隆 CD271 抗体（同种型：小鼠 IgG1）偶联的磁珠。

2 mL 人 FcR **阻断剂**：人 IgG

[规格] 可分选 10^9 个细胞总量，多达 100 次分离。

[保存形式] 所有试剂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。

交叉反应： 据报道，CD271 磁珠可与猴子、狗、猪、绵羊和山羊细胞发生反应。

[分选原理]

首先，用 CD271 磁珠对 CD271+ 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 CD271+ 细胞被保留在分选柱中，未标记的细胞顺着分选柱流出。将分选柱从磁场中移出后，磁性保留的 CD271+ 细胞可作为正选细胞部分被洗脱出来。为了提高纯度，含有 CD271+ 细胞的正选细胞部分必须在第二个分选柱上分离。

[背景信息]

CD271，也称为 LNGFR（低亲和力神经生长因子受体）或 p75NTR，属于低亲和力神经生长因子受体和肿瘤坏死因子受体超家族。

CD271 是间充质干细胞（也称为间充质基质细胞（MSCs），来自骨髓抽吸物或脂肪抽吸物）的典型标记物。分离后，仅在 CD271 + 细胞群中发现成纤维细胞集落形成单位（CFU-F）活性，而在 CD271- 群体中未发现。与通过贴壁分离的 MSC 相比，使用分离试剂盒分离的 CD271 + 细胞具有更高的增殖能力。分离的 CD271 + MSCs 中生长因子的分泌明显增加。

CD271 (LNGFR) 最初被描述为在中枢和周围神经系统细胞上表达，并被认为是与神经细胞的发育，存活和分化有关。可以使用神经脊干/祖细胞分离试剂盒有效分离 CD271 + 神经脊祖细胞。

[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： CD271 阳性细胞可以用 xM、xL 分选柱富集。强烈表达 CD271 抗原的细胞也可以用 xM、xL 分选柱去除。
- (可选) 荧光偶联的 CD271 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) 用于清除死细胞的死细胞去除试剂盒。
- (可选) 预分离过滤器去除细胞团块。
- (可选) MSC 扩增培养基

[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：要去除密度梯度分离后的血小板，可将细胞颗粒重悬于缓冲液中，然后在 20 °C 下以 200 ×g 离心 10-15 分钟。小心吸出上清液。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 μm 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。

▲ 建议孵育温度为 2-8 °C。温度过高和/或孵育时间过长可能导致细胞标记不特异。在冰上操作可能需要延长孵育时间。

▲ 如果要将 CD271+ 间充质干细胞进行培养，建议一开始至少使用 2×10^7 骨髓单核细胞（BM MNCs），以获得足够的细胞数量用于随后的 CD271+ 细胞培养。

1. 细胞计数。
 2. 300×g 离心 10 分钟。去除上清。
 3. 每 10^7 个细胞总量使用 60 μL 缓冲液重悬。
 4. 每 10^7 个细胞总量添加 20 μL 人 FcR 阻断剂和 20 μL CD271 磁珠。
 5. 混匀，2-8 °C 孵育 15 分钟。
 6. 每 10^7 个细胞加入 1-2 mL 缓冲液洗涤细胞，300×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。
- ▲ 注：细胞数量增多需相应地增加缓冲液的体积。
8. 进行细胞分选步骤。

三、细胞分选

- ▲ 根据总细胞数和 CD271+ 细胞数选择合适的分选柱和分选器。
- ▲ 一定要等到分选柱储液器排空后再进行下一步。

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。
4. 结合磁珠的细胞会被吸附到分选柱上，没有结合的细胞会顺着液体流下来。加适量的缓冲液，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，这是未标记的细胞。

xM: 3×500 μL xL: 3×3 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，得到就是目的细胞。

xM: 1 mL

xL: 5 mL

7. (可选)为了提高 CD271+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。