

肿瘤细胞分选试剂盒，人(92-01-0173)

[组分]

1 mL 人非肿瘤细胞去除混合物 A

1 mL 人非肿瘤细胞去除混合物 B

[规格] 可分选最多 10^8 个肿瘤细胞或可分选最多 5×10^8 个（包括红细胞）细胞总量，多达 50 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] $2 - 8^\circ\text{C}$ 避光保存，请勿冷冻。有效期见试剂外标签。

[分选原理]

首先，用单克隆抗体混合物偶联的磁珠对非肿瘤细胞进行磁性标记。然后，将细胞悬浮液装入置于分选器磁场的柱中。磁性标记的非肿瘤细胞被保留在柱中，未标记的人肿瘤细胞顺着分选柱流出。将柱从磁场中移出后，磁性保留的非肿瘤细胞可被洗脱出来。

[背景信息]

人肿瘤细胞分离试剂盒的设计旨在从原始样本中富集未标记的人肿瘤细胞。在体内生长阶段，肿瘤组织被非肿瘤来源的细胞血管化和浸润，包括异质淋巴细胞亚群，成纤维细胞和内皮细胞。

浸润水平高度依赖于多种因素，例如肿瘤亚型，生长速率和受影响的器官部位。但是，即使这些因素恒定，浸润细胞的数量和组成也高度可变，这使得精确的分子下游分析变得困难。污染的非肿瘤细胞

导致非肿瘤细胞衍生的 mRNA 分子与微阵列探针杂交，并在下一代测序或蛋白质组分析过程中测量无关信号而导致灵敏度显著降低。另外，人肿瘤细胞的培养经常被过度生长在靶细胞上的成纤维细胞所阻碍。为了获得最佳结果，应将人肿瘤细胞分离试剂盒与人肿瘤分离试剂盒和组织解离器结合使用。

[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。
- 分选柱和分离器： 为了获得最佳的纯度和回收率，强烈推荐使用 xL 柱。
- 人肿瘤分离试剂盒用于从肿瘤组织中制备单细胞悬液。
- (可选) 预分离过滤器（70 μm）去除细胞团块。
- (可选) PI 或 7-AAD 可以用于流式分析中排除死细胞。
- (可选) 荧光偶联的抗体用于流式分析，例如：CD326 (EpCAM)-VioBlue、CD31-PE。

一、样本准备

为了制备人肿瘤单细胞悬浮液，使用人肿瘤分离试剂盒与组织解离器结合使用。

二、磁珠标记

▲在处理肉瘤、间叶性卵巢癌或间叶性胶质母细胞瘤时，请勿使用非肿瘤细胞去除混合物 B 进行分离。详情请参阅步骤 3 和 4。

▲ 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 2×10^6 个肿瘤细胞和/或最多 1×10^7 个（包含红细胞）细胞总量。当处理更少的细胞数量时，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 4×10^6 个肿瘤细胞或 2×10^7 个总细胞，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 $70 \mu\text{m}$ 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. 使用 $60 \mu\text{L}$ 缓冲液重悬最多 2×10^6 个肿瘤细胞或最多 10^7 个总细胞数。

在处理肉瘤、间叶性卵巢癌或间叶性胶质母细胞瘤时，用 $80 \mu\text{L}$ 缓冲液重悬。

▲ 注：始终使用新鲜配制的缓冲液。

4. 加入 $20 \mu\text{L}$ 的非肿瘤细胞去除混合物 A 和 $20 \mu\text{L}$ 的非肿瘤细胞去除混合物 B。

在处理肉瘤、间叶性卵巢癌或间叶性胶质母细胞瘤时，只加入 $20 \mu\text{L}$ 的非肿瘤细胞去除混合物 A。

不要使用非肿瘤细胞去除混合物 B。

5. 混匀， $2-8^\circ\text{C}$ 孵育 15 分钟。

6. 使用缓冲液调节体积至 $500 \mu\text{L}$ ，最多可容纳 2×10^6 肿瘤细胞或最多 10^7 总细胞。

▲ 注：在一个 $\times\text{L}$ 分选柱上最多可处理 10^7 个肿瘤细胞或 5×10^7 个总细胞。如果使用更多的细胞，将样品拆分到多个 $\times\text{L}$ 柱上。

7. 进行细胞分选步骤。

三、细胞分选

▲ 始终等到分选柱储液器排空后再进行下一步操作。

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 3 mL 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，这是人肿瘤细胞。
4. 加 1 mL 的缓冲液洗脱，待液体全部流尽，再加入适量缓冲液，一共洗 2 次。收集总流出物和第三步流出物混合。
5. （可选）将分选柱从分选器中取出，并将其放在合适的收集管上。加入 3 mL 的缓冲液到分选柱中，迅速用塞子推下，得到就是非目的细胞。