

CD171 (L1CAM) 分选磁珠试剂盒，小鼠(92-01-0301)

[组分]

1 mL CD171 (L1CAM) 磁珠，小鼠：与单克隆 CD171 (L1CAM) 抗体(同型:大鼠 IgG2a)偶联的磁珠。

1 mL FcR 阻断试剂，小鼠

[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。

[分选原理]

首先，用 FcR 阻断试剂阻断小鼠 Fc 受体。然后，用 CD171 (L1CAM)磁珠对 CD171 (L1CAM)+细胞进行磁性标记。细胞悬浮液被装载到分选柱上，该分选柱被放置在分选器的磁场中。磁性标记的 CD171 (L1CAM)+细胞保留在柱内，未标记的细胞顺着分选柱流出。将分选柱移出磁场后，磁性保留的 CD171 (L1CAM)+细胞可以作为阳选细胞部分被洗脱。为了提高纯度，含有 CD171 (L1CAM)+细胞的阳选部分可以在第二个分选柱上分离。

[背景信息]

CD171 (L1CAM) 磁珠 (L1CAM: L1 细胞粘附分子) 是根据 CD171 (L1CAM) 抗原的表达而开发的，用于分离小鼠细胞。

细胞粘附分子 CD171 在破伤风毒素阳性的神经元、内皮细胞、某些上皮细胞、网状成纤维细胞和几种恶性肿瘤（包括结肠癌和乳腺癌、结肠黑色素瘤以及神经元和间皮细胞来源的肿瘤细胞）上都有表达，CD171 在促进肿瘤生长方面的作用已得到证实。

CD171 在细胞粘附和信号转导中发挥着重要作用。它参与神经系统的发育，并调节神经元与神经元之间的粘附、髓鞘化、轴突导向和神经元迁移等过程。

CD171 (L1CAM) 磁珠根据 CD171 (L1CAM) 的表达情况特别优化了神经元的分离。该分离方法是在来自出生后第 8 天 (P8) 以下动物的离体 CD-1 小鼠脑组织上进行优化的。

P7 小脑组织的纯度高达 99.5%，因为这里的 CD171 几乎只在神经元上表达。纯度随着年龄的增长而降低：P9 最高为 80%；P12 最高为 64%。对于其他脑区，如果需要高纯度，可能需要去除胶质细胞。

CD171 (L1CAM) 表位对木瓜蛋白酶敏感。因此，建议在细胞分离前使用神经组织分离试剂盒 (T)。

[试剂和仪器要求]

● DPBS/BSA 缓冲液： 制备含有 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的 Dulbecco 磷酸盐缓冲液(DPBS)和 0.5%牛血清白蛋白(BSA)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：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。

● 神经组织分离试剂盒(T)

● (可选) 预分离过滤器去除细胞团块。

● 分选柱和分选器：CD171 阳性细胞可以用 xM、xL 分选柱富集。

- (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) 组织解离器, 全自动组织解离器

[步骤]

一、样本准备

对于神经组织单细胞悬浮液的制备, 请参阅神经组织解离试剂盒(T)的说明书, 该试剂盒可与组织解离器结合使用。

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。为了获得最佳性能, 至少使用 5×10^6 个细胞数。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 $70 \mu\text{m}$ 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. 每 10^7 个细胞总量使用 $80 \mu\text{L}$ 缓冲液重悬。

4. 每 10^7 个细胞总量添加 10 μ L FcR 阻断剂。
5. 混匀，不要涡旋，2-8 $^{\circ}$ C 孵育 10 分钟。
6. 每 10^7 个细胞总量添加 10 μ L CD171 磁珠。
7. 混匀，不要涡旋，2-8 $^{\circ}$ C 孵育 15 分钟。
8. 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。
9. 用 500 μ L 缓冲液重悬最多 10^7 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 CD171+细胞数选择合适的分选柱和分选器。**
- ▲ 注：**为了获得最高纯度的 CD171 (L1CAM)+细胞，建议使用 xM 分选柱。为了获得回收率最高的 CD171 (L1CAM)+细胞推荐使用 xL 分选柱。
- ▲ 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 μ 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: 3×500 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 CD171+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。

▲ 注：分离后的柱上细胞如需直接入培养，需用细胞培养基洗脱，否则照例用缓冲液洗脱。

▲ 注：尽量减少 PBS/BSA 缓冲液中细胞的处理时间。