

## CD326 (EpCAM) 分选磁珠，人(92-01-0047)

### [组分]

人 CD326 (EpCAM) 磁珠：与单克隆抗体（同型：小鼠 IgG1）偶联的磁珠。

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

[保存形式] CD326 (EpCAM) 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 CD326 (EpCAM) 磁珠对 CD326 (EpCAM) + 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 CD326 (EpCAM) + 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 CD326 (EpCAM) + 细胞可作为正选细胞部分被洗脱出来。为了提高纯度，含有 CD326 (EpCAM)+细胞的阳选部分必须在第二个分选柱上分离。

### [背景信息]

CD326，也称为人上皮抗原（HEA），上皮细胞粘附分子（EpCAM）广泛表达于上皮源性细胞和上皮源性肿瘤细胞上。

CD326 (EpCAM)磁珠用于癌患者外周血、骨髓、淋巴组织和浆液积液中活的上皮肿瘤细胞的阳性分选。为了防止 FcR 介导的非上皮细胞的非特异性标记，强烈建议在磁性标记之前使用 FcR 阻断试剂。

## [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。
- ▲ 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：CD326 (EpCAM) 阳性细胞可以用 xM、xL 分选柱富集。强烈表达 CD326 (EpCAM) 抗原的细胞也可以用 xM、xL 分选柱去除。
- (可选) 荧光偶联的 CD326 (EpCAM) 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：密度梯度分离后除去血小板，将细胞重悬于缓冲液中，在 200×g 下 20°C 离心 10-15 分钟。小心抽吸上清。重复洗涤步骤。

当处理组织时，使用组织解离器制备单细胞悬浮液。

▲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  $2 \times 10^7$  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。

▲ 在处理患者样本时，始终包括阳性和阴性对照。作为阳性对照，应使用加有肿瘤细胞的 PBMC。对于阴性对照，只需使用健康供体的 PBMC。

▲ 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  $5 \times 10^7$  个细胞总量使用  $300 \mu\text{L}$  缓冲液重悬。

4. 每  $5 \times 10^7$  个细胞总量添加  $100 \mu\text{L}$  FcR 阻断试剂，混匀。

▲注：应使用 FcR 阻断试剂阻断 Fc 受体介导的非上皮细胞标记。

5. 每  $5 \times 10^7$  个细胞总量添加  $100 \mu\text{L}$  CD326 (EpCAM)磁珠。

6. 混匀， $2-8^\circ\text{C}$  孵育 30 分钟。

7. (可选) 根据说明书推荐, 添加染色抗体。
8. 每  $5 \times 10^7$  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  $\mu$ 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 CD326 (EpCAM)+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  $\mu$ 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 4 次。收集总流出物和第三步流出物混合。  
xM:  $4 \times 500 \mu$ L                      xL:  $4 \times 3$  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, 得到就是磁性标记的细胞。  
xM: 1 mL                              xL: 5 mL

7. (可选)为了提高 CD326 (EpCAM)+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。