

从人脐带血分离CD34⁺细胞

背景介绍

从人脐带血 (CB) 中分离CD34⁺细胞是造血干/祖细胞研究中非常关键的一步。但由于脐带血中CD34⁺细胞的含量较低 (通常占有核细胞的0.1% - 1%)、样本血量有限且不同来源的脐带血中的细胞质量和细胞活性差异性较大, 因此从脐带血获得较高纯度和高回收率的CD34⁺细胞非常关键。本篇技术公告描述了两种用于从整个CB中分离CD34⁺细胞的EasySep™细胞分选试剂盒, 可用于包含不同量血小板的样本。

脐带血CD34⁺细胞的正选

只需要使用简单的两步法即可从整个CB分离CD34⁺细胞。首先, 使用RosetteSep™人脐带血CD34预富集抗体混合物 (含能结合成熟血细胞的抗体), 通过标准的密度梯度离心对CD34⁺细胞进行预富集。我们提供两种用于CD34⁺预富集的RosetteSep™抗体混合物:

- 人脐带血CD34正选试剂盒II (产品号 #17896), 其中包含能结合T细胞、B细胞、红细胞 (RBCs)、髓系细胞和血小板的RosetteSep™抗体混合物。该抗体混合物推荐用于从包含大量血小板的CB样本中预富集CD34⁺细胞, 若不去除这些血小板, 可能会影响CD34⁺细胞的质量和纯度。
- 人脐带血CD34正选试剂盒III (产品号 #17897), 其中包含能结合T细胞、B细胞、红细胞 (RBCs)和髓系细胞的RosetteSep™抗体混合物。该抗体混合物推荐用于从包含少量血小板或无需去除血小板的CB样本中预富集CD34⁺细胞。

RosetteSep™抗体混合物将不需要的成熟细胞与样本中的红细胞 (RBCs) 交联, 形成免疫玫瑰花环结构 (immunorosettes), 接着将交联后的样本加入到标准密度梯度离心液 (如: Lymphoprep™) 上再进行离心 (图1, 步骤1-3)。从血浆和密度梯度离心液之间的界面收集预富集的CD34⁺细胞, 而不需要的成熟的细胞和RBCs留在沉淀中 (图1, 步骤3-4)。

也可使用SepMate™管进行密度梯度离心。SepMate™管内置独特的插件, 可防止密度梯度离心液和血液样本发生混合。首先使用移液管从插件中央的小孔加入密度梯度离心液, 再将样本倾倒入或快速移液至插件上方, 免去了将样本沿管壁小心地加至密度梯度离心液之上这一费时费力的步骤。离心仅需10分钟, 且该步骤中可开启离心机刹车, 进一步减少了分选需要的时间。离心后, 富集的CD34⁺细胞可被轻松地倾倒入至一个新的试管中。

优势

快速、简单。 将您标准的密度梯度离心步骤与RosetteSep™结合使用进行预富集, 再使用EasySep™分离得到纯化的CD34⁺细胞。

一致性。 使用SepMate™管进行RosetteSep™分离步骤, 最小化不同分选之间的差异并增加样本的通量。

灵活。 试剂盒可用于整个CB (是否需要去除血小板请参考具体试剂盒说明书)。

然后, 预富集的CD34⁺细胞通过孵育被EasySep™分选抗体混合物和EasySep™ Dextran RapidSpheres™磁珠 (图1, 步骤5-6) 标记。接着, 将含有被免疫磁珠标记的细胞悬液的试管放入合适的EasySep™磁极中, 经过短暂的孵育后, 非目的细胞被简单倾倒入, 而目的CD34⁺细胞被保留在试管内 (图1, 步骤7-8)。分离所得的CD34⁺细胞可立即用于下游应用。



EasySep™人脐带血CD34正选试剂盒和EasySep™磁极 (磁极单独售卖)

去除血小板

使用EasySep™分离CD34⁺之前, 在RosetteSep™预富集过程中去除血小板, 与传统的离心方法相比, 可提高纯化细胞的回收率。然而, 在某些情况下, 并不需要去除血小板。

- 试剂盒II (产品号 #17896) 中的RosetteSep™抗体混合物通过标记血小板在预富集步骤中将其去除。该试剂盒推荐用于采集后放置超过24小时且有一定量血小板活化或聚集的样本。图2和表1中展示了试剂盒II的相关实验结果 (第3页)。
- 试剂盒III (产品号 #17897) 中的RosetteSep™抗体混合物不标记血小板, 推荐用于新鲜的CB样本 (采集后放置小于24h), 含有非

常少量血小板的样本和不需要去除血小板的样本。图3和表2中展示了试剂盒III的相关实验结果 (第3页)。

CD34⁺细胞预富集和正选的常规操作步骤

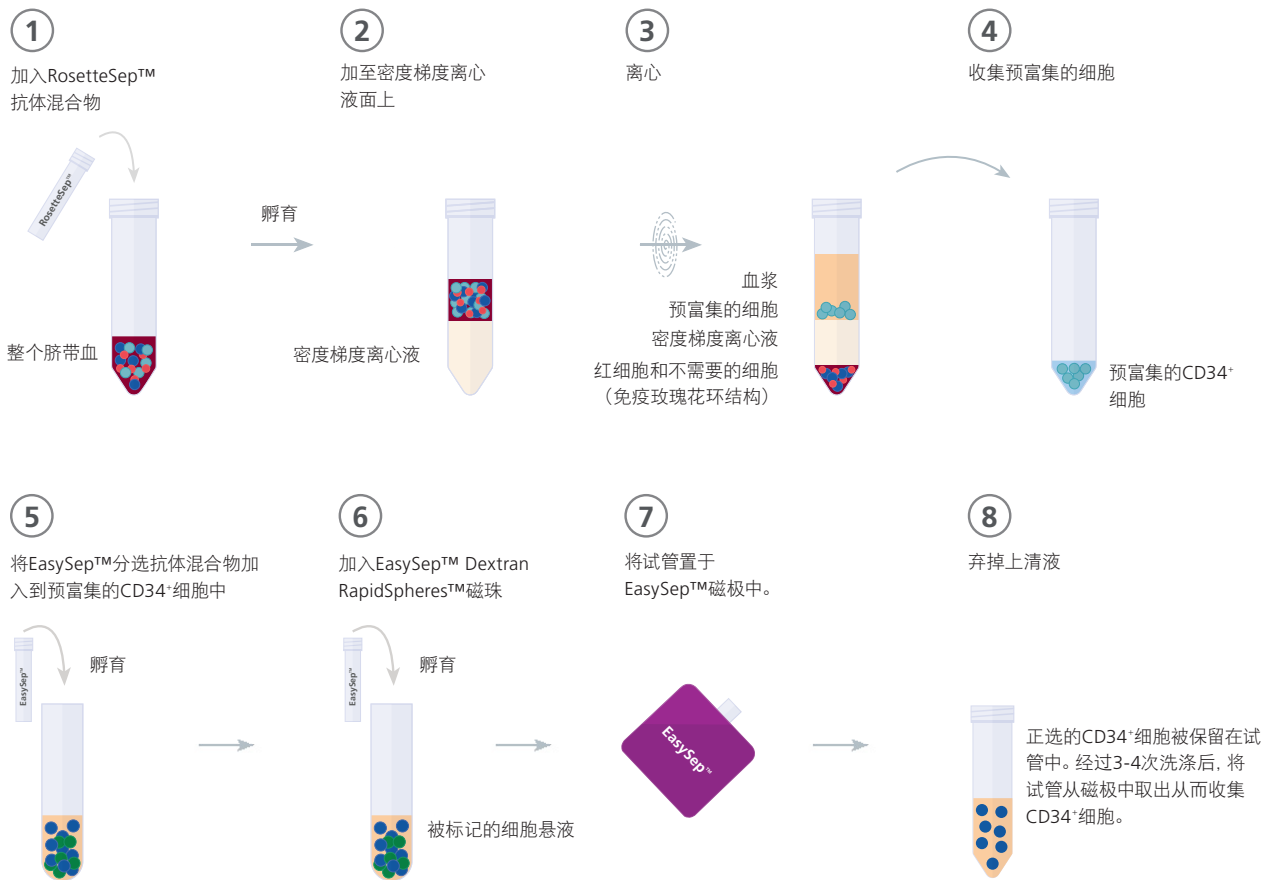


图1. RosetteSep™和EasySep™结合使用分离CD34⁺细胞

使用RosetteSep™ (步骤1-4) 和EasySep™ (步骤5-8) 从整个CB中分离CD34⁺细胞。由于SepMate™管含有阻止不同液面混合的插件, 因此结合SepMate™和RosetteSep™进行预富集能加快样本和密度梯度离心液的分层。若使用SepMate™管可开启离心机刹车, 若使用标准的锥形管则需关闭离心机刹车 (缓慢降速)。离心后, 预富集的CD34⁺细胞被收集到一个新的试管中 (图4)。接着, 在预富集的细胞中加入EasySep™分选抗体混合物和Dextran RapidSpheres™磁珠来标记CD34⁺细胞 (步骤5-6)。将被标记的细胞置于磁极中以进行CD34⁺细胞的正选。分选后, 纯化的细胞可立即用于下游应用。若需了解使用EasySep™紫色磁极 (产品号 #18000), “The Big Easy”磁极 (产品号 #18001), EasyEights™磁极 (产品号 #18103) 或使用RoboSep™ (产品号 #21000/23000) 进行全自动细胞分选的操作步骤, 请至www.EasySep.com参考相关的产品说明书 (PIS)。

实验数据

人脐带血CD34正选试剂盒II

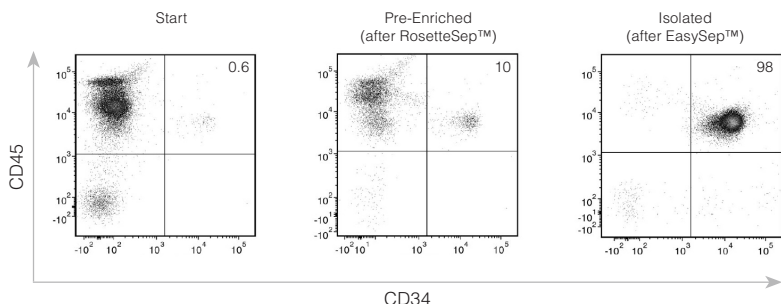


图2. 使用EasySep™人脐带血CD34正选试剂盒II分离CD34⁺ CB细胞

以上图示为分选前起始样本、RosetteSep™预富集后以及使用EasySep™试剂盒II (产品号 #17896) 分选后细胞上CD45和CD34的表达。所示结果为常规实验操作的结果。得到的CD45⁺CD34⁺ HSPCs (右上方象限) 的占比经RosetteSep™预富集后增加了15倍 (从0.6%到10%) 以上, 经EasySep™ CD34⁺分选后增加了200倍 (从0.6%到98%) 以上。流式细胞仪数据以具有中向到高前向散射 (FSC) 的细胞设门, 并在PI检测中呈阴性以排除细胞碎片、RBC、血小板和死细胞。表1总结了从15种不同的CB样本进行细胞分离的结果。

表1. 使用EasySep™人脐带血CD34正选试剂盒II从不同的CB样本分离的CD34⁺细胞的纯度

脐带血样本	CD34 ⁺ 细胞的纯度(%)		
	起始样本	预富集后的细胞	分选后的CD34 ⁺ 细胞
平均值	0.4	6	91
范围	0.2 - 0.9	1 - 10	76 - 98

图3. 使用EasySep™人脐带血CD34正选试剂盒III分离CD34⁺ CB细胞

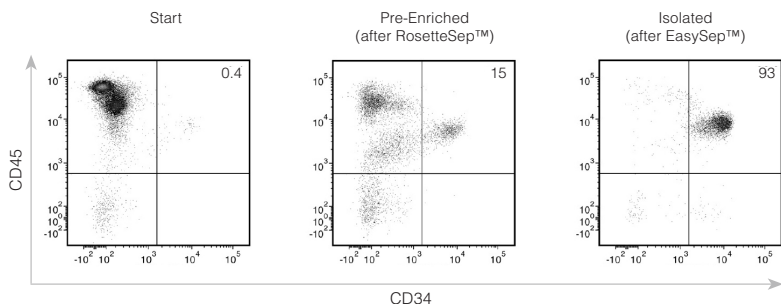


图3. 使用EasySep™人脐带血CD34正选试剂盒III分离CD34⁺ CB细胞

以上图示为分选前起始样本、RosetteSep™预富集后以及使用EasySep™试剂盒III (产品号 #17897) 分选后细胞上CD45和CD34的表达。所示结果为常规实验操作的结果, 设门方法请参见图2。表2总结了从10种不同的CB样本进行细胞分离的结果。

表2. 使用EasySep™人脐带血CD34正选试剂盒III从不同的新鲜CB样本分离的CD34⁺细胞的纯度

脐带血样本	CD34 ⁺ 细胞的纯度(%)		
	起始样本	预富集后的细胞	分选后的CD34 ⁺ 细胞
平均值	0.5	11	87
范围	0.1 - 0.9	4 - 21	56 - 99

产品信息

	EasySep™人脐带血CD34正选试剂盒II 产品号# 17896	EasySep™人脐带血CD34正选试剂盒III 产品号# 17897
推荐用于	从采集后放置超过24小时的整个脐带血样本分离CD34+细胞, 需要去除血小板	从采集后放置小于24小时的整个脐带血样本分离CD34+细胞, 不需要去除血小板
试剂盒组分:		
RosetteSep™抗体混合物	15896C	15226C
EasySep™分选混合物	18096C	18096C
EasySep™ Dextran RapidSpheres™	50100	50100

*每个试剂盒包含的试剂可处理1000 mL CB

其它材料*

- 50 mL锥形管, 如: SepMate™-50 (产品号 #15450)
- 5 mL或14 mL聚苯乙烯圆底管
- EasySep™缓冲液 (产品号 #20144), RoboSep™缓冲液 (产品号 #20104); 或者含2%胎牛血清 (FBS) 和1 mM EDTA的PBS
- 密度梯度离心液, 如: Lymphoprep™ (产品号 #07801)
- EasySep™磁极 (产品号 #18000/18001/18103) 或 RoboSep™全自动细胞分选仪 (产品号 #21000/23000)

*不包括在试剂盒内

其它用于分离人CD34+细胞的试剂盒

- 从只需去除粒细胞和RBC的整个CB样本中分离CD34+细胞, 推荐使用EasySep™人脐带血CD34正选试剂盒II (产品号 #17896)
- 从新鲜外周血或白膜层分离CD34+细胞, 推荐使用人全血CD34+细胞完全试剂盒 (产品号 #15086)。
- 从其它样本分离CD34+细胞, 包括新鲜或冻存的动员外周血、骨髓单个核细胞、冻存的脐带血来源的单个核细胞, 推荐使用EasySep™人CD34+正选试剂盒II (产品号 #17856)。

CD34+细胞的培养

分选后, 可使用专门的细胞培养基 (如含有细胞因子或其它添加物的StemSpan™无血清培养基) 培养CD34+细胞。StemSpan™扩增添加物中优化了细胞因子和添加物的配比, 以促进HSPCs的扩增或它们的谱系特异性分化, 从而生成大量成熟的红系细胞、巨核细胞或髓系细胞, 其具体取决于所用的添加物种类。纯化的CD34+细胞也可以使用基于甲基纤维素的MethoCult™培养基进行集落形成单位 (CFU) 检测, 或使用MyeloCult™培养基进行LTC-IC分析。

产品名称	产品描述	产品号 #
扩增和分化:		
StemSpan™培养基	无血清, 无异种成分且无动物源成分的液体培养基。	09600 / 09605 / 09800 / 09805
StemSpan™扩增添加物	细胞因子混合物, 用于扩增CD34+细胞或将CD34+细胞分化为红系细胞、巨核细胞或髓系细胞	02691 / 02692 / 02696 / 02693
分析:		
MethoCult™培养基	基于甲基纤维素的培养基, 用于HSPCs的CFU检测	04034 / 04434 / 04435
MyeloCult™培养基	支持人造血细胞和基质细胞饲养层的长期培养	05100 / 05150

版权所有© STEMCELL Technologies Inc. 2020。保留一切权利, 包括图形和图像。STEMCELL Technologies及其设计及徽标, 以及Scientists Helping Scientists、EasySep、RosetteSep、SepMate、RapidSpheres、Robo Sep、StemSpan、MyeloCult和MethoCult均是STEMCELL Technologies Canada Inc.的注册商标。STEMCELL尽力确保STEMCELL及其供应商提供的信息正确无误, 对此类信息的准确性或完整性不作任何保证或声明。

STEMCELL TECHNOLOGIES INC. 的质量管理体系已经过ISO 13485医疗器械标准认证。产品仅供研究使用, 除非另行说明, 不可用于人或动物的诊断或治疗。



微信ID: STEMCELLTech



STEMCELL Technologies China Co. Ltd.

电话: 400 885 9050 E-MAIL: INFO.CN@STEMCELL.COM 网站: WWW.STEMCELL.COM

文档号 #27003CN 版本 2.0.0 2020年04月