

EasySep™人 Th17 细胞富集试剂盒II

可处理 2×10^9 个细胞

产品号 #17862

正选

文档号 #1000035711 | 版本00



Scientists Helping Scientists™ | WWW.STEMCELL.COM

电话: 400 885 9050

E-MAIL: INFO.CN@STEMCELL.COM

产品介绍

通过操作简单的两步法,从新鲜的人外周血单个核细胞(PBMCs)或白细胞单采样本中分离高纯度的Th17(CD4+CXCR3-CCR6+)细胞。

- 操作简单、快捷
- 纯度高达 98%
- 无需分离柱

首先,使用抗体复合物和EasySep™ Releasable RapidSpheres™ 通过无柱免疫磁珠正选来分离CCR6+细胞。接着,从经EasySep™ 分离的CCR6+细胞中去除结合的磁珠,并通过抗体复合物和EasySep™ Dextran RapidSpheres™ 去除不需要的非CD4+ T细胞、CD45RA+细胞和CXCR3+ 细胞。最终分选得到的细胞中富含能分泌IL-17的Th17细胞,可立即用于下游应用。使用该EasySep™ Release 试剂盒分选之后,细胞表面仍结合有抗体复合物,并可能与Brilliant Violet™ 偶联的抗体、聚乙二醇修饰的蛋白质或其他化学相关配体相互作用。

包含组分

组分名称	组分号#	规格	储存方式	效期	成分
EasySep™ 人 CCR6 正选抗体混合物 II	17872 C	1 x 0.5 mL	2 - 8°C 储存, 勿冷冻。	具体效期请见标签。	保存在含0.1% BSA 的 PBS 中的单克隆抗体混合物, 包含 Fc 受体阻断抗体。
EasySep™ 人 CD4+CXCR3- T 细胞预富集抗体混合物	19152 C.1	1 x 1 mL	2 - 8°C 储存, 勿冷冻。	具体效期请见标签。	保存在 PBS 中的单克隆抗体混合物。
EasySep™ Releasable RapidSpheres™ 50201	50201	4 x 1 mL	2 - 8°C 储存, 勿冷冻。	具体效期请见标签。	保存在水中的磁珠悬浮液。
EasySep™ Dextran RapidSpheres™ 50103	50103	1 x 1 mL	2 - 8°C 储存, 勿冷冻。	具体效期请见标签。	保存在水中的磁珠悬浮液。
EasySep™ Release 缓冲液	20145	2 x 1 mL	2 - 8°C 储存, 勿冷冻。	具体效期请见标签。	用于正选后从细胞上解离 Releasable RapidSpheres™ 的缓冲液。

BSA - 牛血清白蛋白; PBS - 磷酸盐缓冲液

试剂盒组分可在室温 (15 - 25°C) 下运输, 但应按照上述说明进行储存。

外周血

通过在密度梯度离心液(如Lymphoprep™, 产品号 #18060)上离心,从全血中制备外周血单个核细胞(PBMC)悬液。如需更快地制备PBMC,可以使用 SepMate™ RUO (产品号 #86450/86415) 或 SepMate™ IVD* (产品号 #85450/85415) 细胞分选管。

制备完成后,将细胞以 1×10^8 细胞/mL 的浓度重悬于推荐缓冲液中。

* SepMate™ (IVD) 在特定地区作为体外诊断设备使用,其预期用途是通过密度梯度离心法从全血或骨髓中分离单个核细胞(MNCs)。SepMate™在符合21 CFR 820标准的cGMP质量管理体系下生产。在其他所有地区, SepMate™仅限于研究用途(RUO)。

裂解的白细胞单采术样本

1. 将氯化铵溶液（产品号 #07800）与白细胞单采术样本以 4: 1 的比例进行混合。
注：如果使用大体积样本（> 20 mL），请首先以 300 x g 离心10 分钟以浓缩白细胞单采术样本。去除上清液，并用原样本体积 1/10 的推荐缓冲液重悬细胞（例如，对于 30 mL 样本，重悬于 3 mL 推荐缓冲液中，并添加 12 mL 氯化铵溶液）。对于小体积样本（≤ 20 mL），将氯化铵溶液直接添加到白细胞单采术样本中。
2. 冰上孵育 15 分钟。
3. 使用推荐缓冲液加满试管以清洗细胞。在室温（15 - 25°C）下以 300 x g 离心 10 分钟。去除上清液。
4. 可选（去除血小板）：
 - a. 使用推荐缓冲液加满试管以清洗细胞。在室温下，关闭刹车，将细胞以 120 x g 离心 10 分钟。小心地去除上清液。
 - b. 重复步骤 4a 一次或多次，直至去除大部分血小板（标志是上清液变澄清）。
5. 将细胞以 1×10^8 细胞/mL 的浓度重悬于推荐的缓冲液中。

推荐缓冲液

EasySep™ 缓冲液（产品号 #20144）或者含2%胎牛血清（FBS）和 1 mM EDTA 的 PBS。缓冲液应该不含 Ca^{++} 和 Mg^{++} 。

使用指南 – EasySep™ 手动实验流程

请参阅第1页和第2页了解样本制备和推荐缓冲液。有关每种磁极的详细使用方法，请参阅表1和表2。

表1.EasySep™人 Th17 细胞富集试剂盒II操作流程

		EASYSEP™ 磁极	
步骤	说明	 EasySep™ (产品号 #18000)	 “The Big Easy” (产品号 #18001)
1	按指定细胞浓度制备样本，样本体积在范围内。	1 x 10 ⁸ 细胞 /mL 0.25 - 2 mL	1 x 10 ⁸ 细胞 /mL 0.5 - 6 mL
	将样本添加到所需的试管中。	5 mL (12 x 75 mm) 聚苯乙烯流式管 (如: 产品号 #38007)	14 mL (17 x 95 mm) 聚苯乙烯流式管 (如: 产品号 #38008)
2	在样本中加入 CCR6 正选抗体混合物。 注意：不要涡旋抗体混合物。	25 µL/mL 样本	25 µL/mL 样本
	混匀并孵育。	室温孵育 5 分钟	室温孵育 5 分钟
3	涡旋Releasable RapidSpheres™。注 意：磁珠应呈均匀分散状态。	30 秒	30 秒
4	将Releasable RapidSpheres™ 加到样本中。	200 µL/mL 样本	200 µL/mL 样本
	混匀并孵育。	室温孵育 5 分钟	室温孵育 5 分钟
5	添加推荐缓冲液，将样本定容至指定体积。 通过轻轻上下吹吸 2 - 3 次来混匀。	定容至 2.5 mL	<ul style="list-style-type: none"> ●若样本 ≤ 4 mL，定容至 5 mL ●若样本 > 4 mL，定容至 10 mL
	将试管（不加盖）放入磁极中并孵育。	室温孵育 5 分钟	室温孵育 5 分钟
6	拿起磁极，以一个连续的动作翻转磁极和试管*， 倾倒入上清液。	弃去上清液	弃去上清液
7	从磁极中取出试管，并使用推荐缓冲液将样本定容至 指定体积。通过轻轻上下吹吸 2 - 3 次来混匀。	定容至 2.5 mL	<ul style="list-style-type: none"> ●若样本 ≤ 4 mL，定容至 5 mL ●若样本 > 4 mL，定容至 10 mL
	将试管（不加盖）放入磁极中并孵育。	室温孵育 3 分钟	室温孵育 3 分钟
8	拿起磁极，以一个连续的动作翻转磁极和试管*， 倾倒入上清液。	弃去上清液	弃去上清液
9	重复以上步骤。	步骤 7 和 8 (总共进行 1 次 5 分钟和 2 次 3 分钟的分选)	步骤 7 和 8 (总共进行 1 次 5 分钟和 2 次 3 分钟的分选)
继续步骤 10，下一页		继续步骤 10，下一页	继续步骤 10，下一页

RT - 室温 (15 - 25°C)

* 保持磁极和流式管倒置 2 - 3 秒，然后翻转回直立位置。不要摇晃或擦拭掉仍可能挂在管口的任何液滴。

		EASYSEP™ 磁极	
步骤	说明 (接上页)	 EasySep™ (产品号 #18000)	 “The Big Easy”™ (产品号 #18001)
10	从磁极中取出试管，并使用推荐缓冲液将样本定容至指定体积。通过轻轻上下吹吸 2 - 3 次来混匀。请确保从管壁上收集细胞。	起始样本体积的一半 [§] （即：步骤1中体积的一半）	起始样本体积的一半 [§] （即：步骤1中体积的一半）
11	在样本中加入Release 缓冲液。	200 µL/mL 重悬的样本	200 µL/mL 重悬的样本
	混匀并孵育。	室温孵育 5 分钟	室温孵育 5 分钟
12	在样本中加入CD4 +CXCR3- T细胞预富集抗体混合物。注意：不要涡旋抗体混合物。	100 µL/mL 重悬的样本	100 µL/mL 重悬的样本
	混匀并孵育	室温孵育 5 分钟	室温孵育 5 分钟
13	涡旋Dextran RapidSpheres™。 注意：磁珠应呈均匀分散状态。	30 秒	30 秒
	将Dextran RapidSpheres™ 加到样本中混匀	50 µL/mL 重悬的样本 不进行孵育，立即进行下一步骤	50 µL/mL 重悬的样本 不进行孵育，立即进行下一步骤
14	添加推荐缓冲液，将样本定容至指定体积。通过轻轻上下吹吸 2 - 3 次来混匀。	定容至 2.5 mL	<ul style="list-style-type: none"> •若样本 ≤ 4 mL，定容至 5 mL •若样本 > 4 mL，定容至 10 mL
	将试管（不加盖）放入磁极中并孵育。	室温孵育 5 分钟	室温孵育 5 分钟
15	拿起磁极，以一个连续的动作翻转磁极和试管*，倾倒富集的细胞悬液至一个新的试管中。	分选后的细胞可立即用于下游应用	分选后的细胞可立即用于下游应用

RT - 室温 (15 - 25°C)

* 保持磁极和流式管倒置 2 - 3 秒，然后翻转回直立位置。不要摇晃或擦拭掉仍可能挂在管口的任何液滴。

§ 后续步骤中试剂的添加量取决于重悬后的样本体积。

表2.EasySep™人 Th17 细胞富集试剂盒II操作流程

		EASYSEPT™磁极		
步骤	说明	EasyEights™ (产品号 #18103)		Easy 50 (产品号 #18002)
		5 mL 流式管	14 mL 流式管	
1	按指定细胞浓度制备样本，样本体积在范围内。	1 x 10 ⁸ 细胞/mL 0.25 - 2 mL	1 x 10 ⁸ 细胞/mL 0.5 - 6 mL	1 x 10 ⁸ 细胞/mL 5 - 40 mL
	将样本添加到所需的试管中。	5 mL (12 x 75 mm) 聚苯乙烯流式管 (例如产品号 #38007)	14 mL (17 x 95 mm) 聚苯乙烯流式管 (例如产品号 #38008)	50 mL (30 x 115 mm) 锥形管 (如: 产品号 #38010)
2	在样本中加入CCR6正选抗体混合物。 注意：不要涡旋抗体混合物。	25 µL/mL 样本	25 µL/mL 样本	25 µL/mL 样本
	混匀并孵育。	室温孵育 5 分钟	室温孵育 5 分钟	室温孵育 5 分钟
3	涡旋Releasable RapidSpheres™。 注意：磁珠应呈均匀分散状态。	30 秒	30 秒	30 秒
4	将Releasable RapidSpheres™ 加到样本中。	200 µL/mL 样本	200 µL/mL 样本	200 µL/mL 样本
	混匀并孵育。	室温孵育 5 分钟	室温孵育 5 分钟	室温孵育 5 分钟
5	添加推荐缓冲液，将样本定容至指定体积。 通过轻轻上下吹吸 2 - 3 次来混匀。	定容至2.5 mL	<ul style="list-style-type: none"> ●若样本 ≤ 4 mL，定容至 5 mL ●若样本 > 4 mL，定容至 10 mL 	<ul style="list-style-type: none"> ●若样本 ≤ 10 mL，定容至 25 mL ●若样本 > 10 mL，定容至 50 mL
	将试管（不加盖）放入磁极中并孵育。	室温孵育 10 分钟	室温孵育 10 分钟	室温孵育 10 分钟
6	小心地吸取**（切勿倾倒）上清液。	弃去上清液	弃去上清液	弃去上清液
7	重复以上步骤。	重复两次步骤 5 和 6 (总共进行 3 次 10 分钟的分选)	重复两次步骤 5 和 6 (总共进行 3 次 10 分钟的分选)	重复两次步骤 5 和 6 (总共进行 3 次 10 分钟的分选)
8	从磁极中取出试管，并使用推荐缓冲液将样本定容至指定体积。通过轻轻上下吹吸 2 - 3 次来混匀。 请确保从管壁上收集细胞。	起始样本体积的一半 [§] (即：步骤 1 中体积的一半)	起始样本体积的一半 [§] (即：步骤 1 中体积的一半)	起始样本体积的一半 [§] (即：步骤 1 中体积的一半)
继续步骤 9，下一页		继续步骤 9，下一页	继续步骤 9，下一页	继续步骤 9，下一页

RT - 室温 (15 - 25°C)

** 使用一个移液管一次收集所有的上清液 (例如，对于EasyEights™ 5 mL流式管，使用一个 2 mL血清移液管 [产品号 #38002]；对于EasyEights™ 14 mL流式管，使用一个10 mL血清移液管[产品号 #38004])。

§ 后续步骤中试剂的添加量取决于重悬后的样本体积。

		EASYSEPTM磁极		
步骤	说明(接上页)	EasyEights™ (产品号 #18103)		Easy 50 (产品号 #18002)
		5 mL 流式管	14 mL 流式管	
9	在样本中加入Release 缓冲液。	200 µL/mL 重悬的样本	200 µL/mL 重悬的样本	200 µL/mL 重悬的样本
	混匀并孵育。	室温孵育 5 分钟	室温孵育 5 分钟	室温孵育 5 分钟
10	在样本中加入CD4+CXCR3- T细胞预富集抗体混合物。 注意：不要涡旋抗体混合物。	100 µL/mL 重悬的样本	100 µL/mL 重悬的样本	100 µL/mL 重悬的样本
	混匀并孵育。	室温孵育 5 分钟	室温孵育 5 分钟	室温孵育 5 分钟
11	涡旋Dextran RapidSpheres™。 注意：磁珠应呈均匀分散状态。	30 秒	30 秒	30 秒
12	将Dextran RapidSpheres™ 加到样本中。	50 µL/mL 重悬的样本	50 µL/mL 重悬的样本	50 µL/mL 重悬的样本
	混匀并孵育。	室温孵育 3 分钟	室温孵育 3 分钟	室温孵育 3 分钟
13	添加推荐缓冲液，将样本定容至指定体积。 通过轻轻上下吹吸 2 - 3 次来混匀。	定容至2.5 mL	<ul style="list-style-type: none"> ●若样本 ≤ 4 mL，定容至 5 mL ●若样本 > 4 mL，定容至 10 mL 	<ul style="list-style-type: none"> ●若样本 ≤ 10 mL，定容至 25 mL ●若样本 > 10 mL，定容至 50 mL
	将试管（不加盖）放入磁极中并孵育。	室温孵育 5 分钟	室温孵育 5 分钟	室温孵育 10 分钟
14	小心地吸出**（切勿倾倒）富集的细胞悬液至一个新的试管。	分选后的细胞可立即用于下游应用	分选后的细胞可立即用于下游应用	分选后的细胞可立即用于下游应用

RT - 室温 (15 - 25°C)

** 使用一个移液管一次收集所有的上清液 (例如, 对于EasyEights™ 5 mL 流式管, 使用一个 2 mL 血清移液管 [产品号 #38002]; 对于EasyEights™ 14 mL 流式管, 使用一个 10 mL 血清移液管 [产品号 #38004])。

注意事项和提示

纯度评估

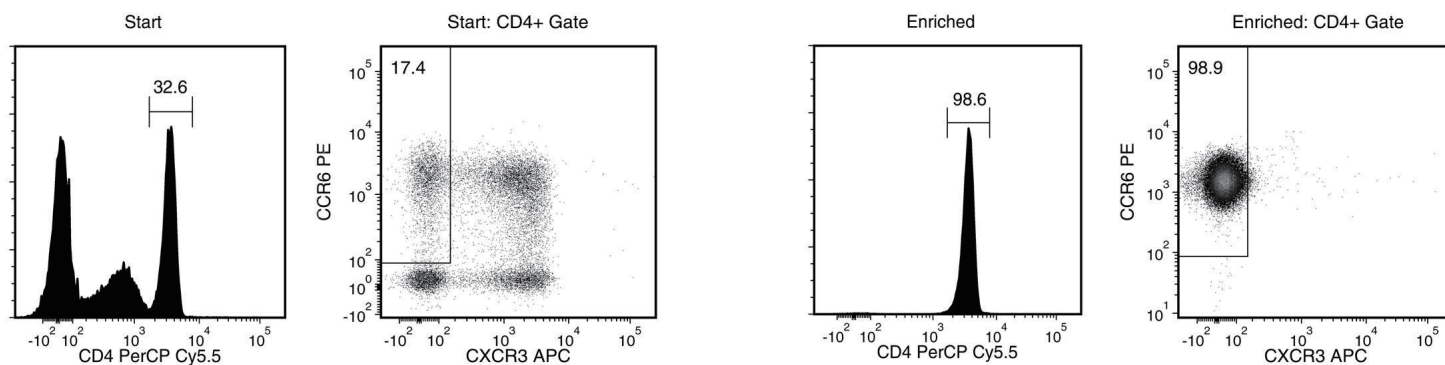
要通过流式细胞术评估Th17 (CD4+CXCR3-CCR6+) 细胞的纯度，请使用以下流式抗体：

- 抗人CD4 抗体，克隆 OKT4 (产品号 #60016)，以及
- 抗人CD183 (CXCR3) 抗体，以及
- 抗人CD196 (CCR6) 抗体

注意：如果使用 Brilliant Violet™ 偶联抗体对 EasySep™ Release 分选的细胞进行染色，请在流式细胞仪或荧光显微镜分析前小心滴定 Brilliant Violet™ 偶联抗体。使用 Brilliant Violet™ 偶联抗体进行纯度评估时，建议使用 BD Horizon Brilliant™ 染色缓冲液以减少非特异性相互作用。如需了解更多信息，请参阅生产厂商的说明或通过info.cn@stemcell.com与我们联系。

此外，可以在使用Phorbol 12 - myristate 13 -acetate (PMA, 产品号 #74042) 和离子霉素 (Ionomycin, 产品号 #73722) 刺激细胞后，通过细胞内染色来检测 IL-17 细胞因子。

实验数据



起始样本为新鲜的 PBMCs，分选后的细胞中 Th17 细胞 (CD4+CXCR3-CCR6+) 含量通常可达96%-98%。用PMA-Ionomycin刺激过夜后，细胞内流式染色检测显示分选后的细胞中6-19%为IL-17+。该数值在不同供体间差异较大。产生IFN- γ 的细胞通常占分选后细胞的<5%。

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。若想了解更多关于产品质量和合规的信息，请访问WWW.STEMCELL.COM/COMPLIANCE。

版权所有© STEMCELL Technologies Inc. 2025。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、EasyEight、EasyPlate、EasySep、SepMate和RapidSpheres均是STEMCELL Technologies Canada Inc.的商标。Lymphoprep是Serumwerk Bernburg AG的商标。以Lymphoprep品牌销售的产品也是由Serumwerk Bernburg AG生产的。所有商标为各自所有者所有。STEMCELL Technologies Inc.对使用本产品时可能发生的专利侵权或违规行为不承担任何责任。STEMCELL尽力确保STEMCELL及其供应商提供的信息正确无误，但对此类信息的准确性或完整性不作任何保证或声明。