

# EasySep™ Direct 人 B-CLL 细胞分选试剂盒

可处理 100 mL 全血

产品号 #19664

负选

文档号 #1000035804 | 版本00



Scientists Helping Scientists™ | [WWW.STEMCELL.COM](http://WWW.STEMCELL.COM)

电话: 400 885 9050

E-MAIL: [INFO.CN@STEMCELL.COM](mailto:INFO.CN@STEMCELL.COM)

## 产品介绍

通过免疫磁珠负选直接从全血中分离高纯度的B-CLL细胞。该试剂盒中的去除抗体混合物不含抗CD43 抗体, CD43 在慢性淋巴细胞白血病(Chronic Lymphocytic Leukemia, CLL) 样本中的恶性细胞上表达。

该试剂盒的优势有:

- > 99.9%的红细胞(RBC)去除率, 无需密度梯度离心、沉降或裂解
- 操作简单、快捷, 且无需分离柱
- 分选得到的细胞不带标记

该试剂盒通过使用识别特异性细胞表面标志物的抗体来去除非B细胞。非目的细胞用抗体和EasySep™ Direct RapidSpheres™磁珠标记, 使用EasySep™磁极进行分选。轻松地将目的细胞收集到新试管中, 分选后的细胞可立即用于下游应用, 例如流式细胞术、培养或DNA/RNA 提取。

## 包含组分

组分名称	组分号#	规格	储存方式	效期	成分
EasySep™ Direct人B - CLL 细胞分选抗体混合物	19664C	2 x 2.5 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™ Direct RapidSpheres™ 50300磁珠	50300	4 x 2.5 mL	2 - 8°C 储存, 勿冷冻。	具体效期请见标签。	保存在PBS中的磁珠和单克隆抗体悬浮液。

PBS - 磷酸盐缓冲液

试剂盒组分可在室温(15 - 25°C)下运输, 并在收到后立即冷藏。抗体混合物中可能会观察到沉淀, 但不会影响使用效果。

## 样本制备

为了最佳去除红细胞, 请使用肝素或酸式枸橼酸盐葡萄糖(ACD)作为抗凝剂来收集血液。不建议使用K2EDTA或K3EDTA作为抗凝剂。

为了获得最佳回收率, 请使用未经处理的人全血。如样本存放时间超过 24 小时, 目的细胞的回收率会降低。

可处理的血液样本量取决于分选过程中所用的EasySep™磁极。血液样本必须放置在所需的试管中, 并正确地放入合适的EasySep™磁极中(参见表1和2)。

## 推荐缓冲液

D - PBS (不含Ca<sup>++</sup>和Mg<sup>++</sup>; 产品号 #37350)。

## 使用指南- EasySep™手动实验流程

请参阅第 1 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 至表 2。

表 1. EasySep™ Direct 人 B-CLL 细胞分选试剂盒操作流程

		EASYSEP™ 磁极	
步骤	说明	 EasySep™ (产品号 #18000)	 “The Big Easy”™ (产品号 #18001)
1	收集一定体积范围内的样本。	0.5 - 1.5 mL	1.5 - 7 mL
	将全血样本添加到所需的试管中。	5 mL (12 x 75 mm) 聚苯乙烯圆底流式管 (如: 产品号 #38007)	14 mL (17 x 95 mm) 聚苯乙烯圆底流式管 (如: 产品号 #38008)
2	涡旋振荡 RapidSpheres™ 磁珠。 注意: 磁珠应呈均匀分散状态。	30 秒	30 秒
3	在样本中加入分选抗体混合物。	50 µL/mL 样本	50 µL/mL 样本
4	将 RapidSpheres™ 磁珠加到样本中。	50 µL/mL 样本	50 µL/mL 样本
5	混匀并孵育。	室温孵育 5 分钟	室温孵育 5 分钟
6	添加推荐的缓冲液，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"> <li>• 若样本 ≤ 5 mL，定容至两倍样本体积</li> <li>• 若样本 &gt; 5 mL，定容至 10 mL</li> </ul>
7	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
8	拿起磁极，以一个连续的动作翻转磁极和试管， 倾倒入富集的细胞悬液*至一个新的试管中。	使用新的 5 mL 流式管	使用新的 14 mL 流式管
9	将 RapidSpheres™ 磁珠添加到含有富集细胞 的新试管中。	使用与步骤 4 相同的体积	使用与步骤 4 相同的体积
	混匀并孵育。	室温孵育 5 分钟	室温孵育 5 分钟
10	从磁极中取出流式管，然后将第 9 步中的试管 (不加盖) 放入磁极中孵育以进行第二次分选。	室温孵育 5 分钟	室温孵育 5 分钟
11	拿起磁极，以一个连续的动作翻转磁极和试管**， 倾倒入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	使用新的 14 mL 流式管
12	从磁极中取出流式管，然后将新流式管（不加盖） 放入磁极中孵育以进行第三次分选。	---	室温孵育 5 分钟
13	拿起磁极，以一个连续的动作翻转磁极和试管**， 倾倒入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

RT - 室温 (15 - 25°C)

\* 第一次磁极分选后，收集的细胞中可能含有大量红细胞，并且看起来可能与起始未处理的人全血样本类似。

\*\* 为了最大限度地减少目的细胞中的红细胞污染，请沿着试管的干净区域（即倒入样本时使用的对面一侧）倒出样本。

表2.EasySep™ Direct 人 B-CLL 细胞分选试剂盒操作流程

步骤	说明	EASYSEPTM 磁极		
		EasySep™ (产品号 #18103)		Easy 50 (产品号 #18002)
		5 mL 流式管	14 mL 流式管	
1	收集一定体积范围内的样本。	0.5 - 1.5 mL	1.5 - 7 mL	7 - 30 mL
	将全血样本添加到所需的试管中。	5 mL (12 x 75 mm) 聚苯乙烯圆底流式管 (如: 产品号 #38007)	14 mL (17 x 95 mm) 聚苯乙烯圆底流式管 (如: 产品号 #38008)	50 mL (30 x 115 mm) 锥形管 (如: 产品号 #38010)
2	涡旋振荡RapidSpheres™磁珠。 注意: 磁珠应呈均匀分散状态。	30 秒	30 秒	30 秒
3	在样本中加入分选抗体混合物。	50 µL/mL 样本	50 µL/mL 样本	50 µL/mL 样本
4	将RapidSpheres™磁珠加到样本中。	50 µL/mL 样本	50 µL/mL 样本	50 µL/mL 样本
5	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
6	添加推荐的缓冲液, 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"> <li>●若样本 ≤ 5 mL, 定容至两倍样本体积</li> <li>●若样本 &gt; 5 mL, 定容至 10 mL</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>●若样本 ≤ 25 mL, 定容至两倍样本体积</li> <li>●若样本 &gt; 25 mL, 定容至 50 mL</li> </ul>
7	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
8	小心地吸出*** (切勿倾倒) 富集的细胞悬液至一个新的试管。 注意: 自上而下收集所有清澈的部分。为了获得最佳回收率, 可一并收集少量红细胞 (最多为起始样本体积的 10%)。	使用新的 5 mL流式管	使用新的 14 mL流式管	使用新的 50 mL锥形管
9	将RapidSpheres™磁珠添加到含有富集细胞的新试管中。	使用与步骤 4 相同的体积	使用与步骤 4 相同的体积	使用与步骤 4 相同的体积
	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	从磁极中取出流式管, 然后将第 9 步中的试管 (不加盖) 放入磁极中孵育以进行第二次分选。	室温孵育 5 分钟	室温孵育 5 分钟	室温孵育 5 分钟
11	小心地吸出*** (切勿倾倒) 富集的细胞悬液至一个新的试管。 注意: 只收集清澈的部分。	使用新的 5 mL流式管	使用新的 14 mL流式管	使用新的 50 mL锥形管
12	从磁极中取出流式管, 然后将含富集细胞的新试管 (不加盖) 放入磁极中孵育以进行第三次分选。	室温孵育 5 分钟	室温孵育 5 分钟	室温孵育 5 分钟
13	小心地吸出*** (切勿倾倒) 富集的细胞悬液至一个新的试管。 注意: 只收集清澈的部分。	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富集的细胞悬液 (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

去除分选的细胞中残留的红细胞

细胞分选后通常不需要进一步去除红细胞。如果实验流程结束后离心，在分选的细胞沉淀中仍然可见残留的红细胞，请使用小体积（0.2 - 2.5 mL）推荐缓冲液或所需的培养基重悬，并置于更小的EasySep™磁极中进行额外 5 分钟的分选。收集上清液；分选后的细胞可直接用于下游应用。残留的红细胞也可以使用氯化铵溶液（产品号 #07800）裂解。

纯度评估

要通过流式细胞术评估B细胞的纯度，请使用以下克隆号的荧光偶联流式抗体：

- 抗人CD19 抗体，克隆HIB19（产品号 #60005），或
- 抗人CD20 抗体，克隆2H7（产品号 #60008），以及
- 抗人CD45 抗体，克隆HI30（产品号 #60018）或克隆2D1（产品号 #60123）

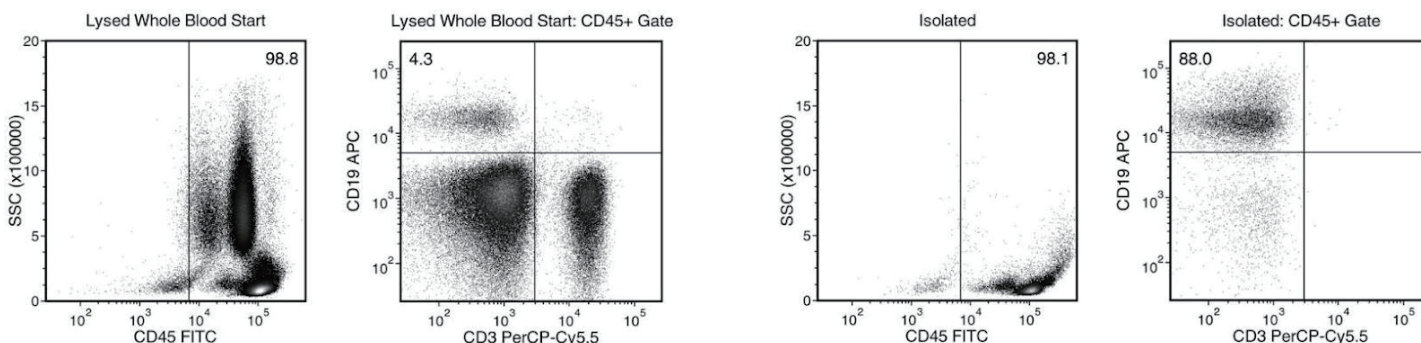
要通过流式细胞术评估B-CLL细胞的纯度，请使用以下克隆号的荧光偶联流式抗体：

- 抗人CD5 抗体，克隆UCHT2（产品号 #60082），以及
- 抗人CD19 抗体，克隆HIB19，以及
- 抗人CD45 抗体，克隆HI30 或克隆2D1

注：建议评估CD45 阳性细胞的纯度，以排除碎片、血小板和红细胞。

## 实验数据

起始样本为来自正常健康供者的全血，未裂红的分选后的B细胞（CD3-CD19+）含量通常为  $87.0 \pm 7.6\%$ （以CD45设门）或  $84.1 \pm 11.7\%$ （未以CD45设门）。



在上述示例中，裂红的全血起始样本和未裂红的分选后的样本中，B细胞（CD3-CD19+）含量分别为4.3%和88.0%（以CD45 设门），或 4.3% 和 86.2%（未以CD45 设门）。未裂红的全血起始样本中的B细胞含量为0.004%（数据未显示）。

注意：对于B细胞起始比例较高的样本（如：CLL样本），分选纯度通常会更高。