

EasySep™ Human Eosinophil Isolation Kit



Scientists Helping Scientists™ | WWW.STEMCELL.COM

TOLL FREE PHONE 1 800 667 0322 • PHONE +1 604 877 0713

INFO@STEMCELL.COM • TECHSUPPORT@STEMCELL.COM

FOR GLOBAL CONTACT DETAILS VISIT OUR WEBSITE

Traitement de 1 x 10⁹ cellules

Numéro de catalogue #17956

Numéro de catalogue #17956RF RoboSep™

Sélection négative

Document #1000030344 | Version 00

Description

Isolez les éosinophiles (CD16-CD66b+CD45+) hautement purifiés par sélection négative immunomagnétique, directement à partir de cellules polymorphonucléaires du sang total humain frais.

- Rapide, facile à utiliser, et sans colonne
- Pureté allant jusqu'à 99%
- Cellules intactes et viables

Ce kit cible les cellules non-éosinophiles pour leur élimination à l'aide d'anticorps reconnaissant des antigènes de surface spécifiques. Les cellules indésirables sont marquées avec des anticorps et particules magnétiques, puis séparées sans colonnes en utilisant un aimant EasySep™. Les cellules isolées sont simplement versées dans un nouveau tube et sont immédiatement disponible pour des applications en aval, telles que la cytométrie en flux, la culture cellulaire, ou l'extraction d'ADN/ARN.

Descriptions des Composants

NOM DU COMPOSANT	N° DU COMPOSANT	QUANTITÉ	ENTREPOSAGE	STABILITÉ	FORMAT
EasySep™ Human Eosinophil Isolation Cocktail	17956C	1 x 1 mL	Conserver à 2 - 8°C. Ne pas congeler.	Stable jusqu'à la date d'expiration (EXP) indiquée sur l'étiquette.	Combinaison d'anticorps monoclonaux dans du PBS.
EasySep™ Dextran RapidSpheres™ 50103	50103	1 x 1 mL	Conserver à 2 - 8°C. Ne pas congeler.	Stable jusqu'à la date d'expiration (EXP) indiquée sur l'étiquette.	Suspension de particules magnétique dans de l'eau.

PBS - solution saline tamponnée au phosphate

Les composants peuvent être expédiés à température ambiante (15 - 25°C) mais doivent être stockés comme indiqué ci-dessus.

Préparation de l'Echantillon

Important: Ne pas utiliser la sédimentation au dextran pour préparer les cellules.

SANG TOTAL UTILISANT LA LYSE DES GLOBULES ROUGES (préféré pour une pureté légèrement supérieure)

1. Collecter le sang total dans un tube de prélèvement sanguin contenant un anticoagulant.
2. Effectuer soigneusement une séparation par gradient de densité standard (par exemple, en utilisant du Lymphoprep™ ; Catalogue #07801). Ne pas utiliser SepMate™.
3. Retirer et jeter la couche de plasma, la bande de cellules mononucléées, et le milieu de gradient de densité, en laissant le culot de globules rouges intact.
4. Ajouter 9 parts de Solution de Chlorure d'Ammonium (Catalogue #07800) à 1 part de culot de globules rouges et bien mélanger.
5. Incuber sur glace pendant 15 minutes puis centrifuger à 300 x g pendant 8 minutes.
6. Jeter le surnageant et laver le culot avec le milieu recommandé froid (2 - 8°C), puis centrifuger à 250 x g pendant 10 minutes.
7. Jeter le surnageant et resuspendre les cellules à une concentration de 5 x 10⁷ cellules/mL dans le milieu recommandé froid.

SANG TOTAL UTILISANT LA SÉDIMENTATION DES CELLULES SANGUINES ROUGES AVEC HETASEP™

(préféré pour un traitement d'échantillon plus rapide, sans lyse)

1. Collecter le sang total dans un tube de prélèvement sanguin contenant un anticoagulant.
2. Ajouter 1 part d'HetaSep™ (Catalogue #07906) à 5 parts de sang total et bien mélanger. Utiliser un tube de la plus petite taille possible permettant de contenir le volume d'HetaSep et de l'échantillon de sang. Un tube de 14 mL est la taille maximale recommandée pour un rendement optimal des leucocytes.
3. Centrifuger l'échantillon à 50 x g pendant 5 minutes à température ambiante (15 - 25°C) avec le frein désactivé.
4. Retirer le tube de la centrifugeuse et laisser le reposer sans perturbation jusqu'à ce que l'interface globule rouge:plasma représente environ 40% du volume total (maximum 10 minutes).
5. Récouter le plasma riche en leucocytes (tout le liquide présent au-dessus de la fraction de globule rouge) dans un tube de 50 mL. Ajouter 4 parts de milieu recommandé froid (2 - 8°C) à 1 part du mélange cellules/plasma récolté.
6. Centrifuger à 500 x g pendant 10 minutes à température ambiante avec le frein en position basse.
7. Jeter le surnageant, laver le culot avec le milieu recommandé froid et centrifuger à 120 x g pendant 10 minutes à température ambiante avec le frein désactivé pour éliminer les plaquettes en excès.
8. Jeter le surnageant et resuspendre les cellules à une concentration de 5 x 10⁷ cellules/mL dans le milieu recommandé froid.

Milieu Recommandé

EasySep™ Buffer (n° de catalogue 20144), RoboSep™ Buffer (n° de catalogue 20104), or PBS contenant 2% de sérum de veau fœtal (SVF) et 1 mM EDTA. Le milieu ne doit pas contenir de Ca²⁺ et Mg²⁺.

Mode d'Emploi – Protocoles Manuels EasySep™

Voir les pages 1 et 2 pour consulter la préparation de l'échantillon et le milieu recommandé. Se reporter aux tableaux 1 et 2 pour obtenir des instructions détaillées concernant la procédure EasySep™ pour chaque aimant.

Table 1. Protocole du EasySep™ Human Eosinophil Isolation Kit

		AIMANTS EASYSEP™	
ÉTAPE	INSTRUCTIONS	 EasySep™ (n° de catalogue 18000)	"The Big Easy" (n° de catalogue 18001) 
1	Préparer l'échantillon à la concentration cellulaire recommandée, dans la fourchette de volume indiquée.	5 x 10 ⁷ cellules/mL 0.25 - 2 mL	5 x 10 ⁷ cellules/mL 1 - 6.5 mL
	Ajouter l'échantillon au tube à essai recommandé	Tube à essai à fond rond en polystyrène de 5 mL (12 x 75 mm) (p. ex., n° de catalogue 38007)	Tube à essai à fond rond en polystyrène de 14 mL (17 x 95 mm) (p. ex., n° de catalogue 38008)
2	Ajouter le cocktail d'isolation à l'échantillon. REMARQUE: Ne pas vortexer.	50 µL/mL d'échantillon	50 µL/mL d'échantillon
	Mélanger et incuber.	TA pendant 5 minutes	TA pendant 5 minutes
3	Vortexer les RapidSpheres™. REMARQUE: Les particules doivent paraître uniformément dispersées.	30 secondes	30 secondes
4	Ajouter les RapidSpheres™ à l'échantillon et mélanger.	50 µL/mL d'échantillon Pas d'incubation. Procéder IMMEDIATEMENT à l'étape suivante.	50 µL/mL d'échantillon Pas d'incubation. Procéder IMMEDIATEMENT à l'étape suivante.
5	Ajouter le milieu recommandé jusqu'à obtention du volume d'échantillon indiqué. Mélanger doucement en pipettant deux ou trois fois.	Remplir jusqu'à 2,5 mL	<ul style="list-style-type: none"> • Remplir jusqu'à 5 mL pour les échantillons ≤ 4 mL • Remplir jusqu'à 10 mL pour les échantillons > 4 mL
	Placer le tube à essai (sans le bouchon) dans l'aimant et incuber.	TA pendant 3 minutes	TA pendant 3 minutes
6	Prendre l'aimant, et en un mouvement continu, retourner l'aimant et le tube,* verser la suspension cellulaire enrichie dans un nouveau tube.	Utiliser un nouveau tube à essai de 5 mL	Utiliser un nouveau tube à essai de 14 mL
7	Retirer le tube de l'aimant ; placer le nouveau tube (sans le bouchon) dans l'aimant et incuber pour une deuxième séparation.	TA pendant 3 minutes	TA pendant 3 minutes
8	Prendre l'aimant, et en un mouvement continu, retourner l'aimant et le tube,* verser la suspension cellulaire enrichie dans un nouveau tube.	Les cellules isolées sont prêtes à être utilisées	Les cellules isolées sont prêtes à être utilisées

TA – température ambiante (entre 15 et 25 °C)

* Laisser l'aimant et le tube retournés pendant 2 à 3 secondes, puis les remettre en position verticale. Ne pas secouer ou collecter les gouttes qui pourraient rester suspendues à l'ouverture du tube.

Table 2. Protocole du EasySep™ Human Eosinophil Isolation Kit

		EASYSEP™ MAGNETS	
ÉTAPE	INSTRUCTIONS	EasyEights™ (n° de catalogue 18103)	
		Tube de 5 mL	Tube de 14 mL
1	Préparer l'échantillon à la concentration cellulaire recommandée, dans la fourchette de volume indiquée.	5 x 10 ⁷ cellules/mL 0.5 - 2 mL	5 x 10 ⁷ cellules/mL 1 - 6.5 mL
	Ajouter l'échantillon au tube à essai recommandé.	Tube à essai à fond rond en polystyrène de 5 mL (12 x 75 mm) (p. ex., n° de catalogue 38007)	Tube à essai à fond rond en polystyrène de 14 mL (17 x 95 mm) (p. ex., n° de catalogue 38008)
2	Ajouter le cocktail d'isolation à l'échantillon. REMARQUE: Ne pas vortexer.	50 µL/mL d'échantillon	50 µL/mL d'échantillon
	Mélanger et incuber.	TA pendant 5 minutes	TA pendant 5 minutes
3	Vortexer les RapidSpheres™. REMARQUE: Les particules doivent paraître uniformément dispersées.	30 secondes	30 secondes
4	Ajouter les RapidSpheres™ à l'échantillon et mélanger	50 µL/mL d'échantillon Pas d'incubation. Procéder IMMEDIATEMENT à l'étape suivante.	50 µL/mL d'échantillon Pas d'incubation. Procéder IMMEDIATEMENT à l'étape suivante.
5	Ajouter le milieu recommandé jusqu'à obtention du volume d'échantillon indiqué. Mélanger doucement en pipettant deux ou trois fois.	Remplir jusqu'à 2,5 mL	<ul style="list-style-type: none"> • Remplir jusqu'à 5mL pour les échantillons ≤ 4 mL • Remplir jusqu'à 10mL pour les échantillons > 4 mL
	Placer le tube à essai (sans le bouchon) dans l'aimant et incuber.	TA pendant 5 minutes	TA pendant 10 minutes
6	Pipetter** soigneusement (ne pas verser) la suspension cellulaire enrichie dans un nouveau tube à essai.	Utiliser un nouveau tube à essai de 5mL	Utiliser un nouveau tube à essai de 14mL
7	Retirer le tube de l'aimant ; placer le nouveau tube (sans le bouchon) dans l'aimant et incuber pour une deuxième séparation.	TA pendant 5 minutes	TA pendant 10 minutes
8	Pipetter** soigneusement (ne pas verser) la suspension cellulaire enrichie dans un nouveau tube à essai.	Les cellules isolées sont prêtes à être utilisées	Les cellules isolées sont prêtes à être utilisées

TA - température ambiante (entre 15 et 25 °C)

** Prélever tout le surageant, d'un seul coup, dans une seule pipette (p. ex., pour un tube à essai de 5 mL EasyEights™, utiliser une pipette sérologique de 2 mL [n° de catalogue 38002]; pour un tube à essai de 14 mL EasyEights™, utiliser une pipette sérologique de 10 mL [n° de catalogue 38004]).

Mode d'Emploi – Protocole entièrement automatisé RoboSep™

Voir les pages 1 et 2 pour consulter la préparation de l'échantillon et le milieu recommandé. Se reporter au tableau 3 pour obtenir des instructions détaillées concernant la procédure RoboSep™

Table 3. Protocole du RoboSep™ Human Eosinophil Isolation Kit

ETAPE	INSTRUCTIONS	RoboSep™ (n° de catalogue 21000)	
1	Préparer l'échantillon à la concentration cellulaire recommandée, dans la fourchette de volume indiquée.	5 x 10 ⁷ cellules/mL 1 - 6.5 mL	
	Ajouter l'échantillon au tube à essai recommandé.	Tube à essai à fond rond en polystyrène de 14 mL (17 x 95 mm) (p. ex., n° de catalogue 38008)	
2	Sélectionner le protocole.	Human Eosinophil Negative Selection 17956-high purity	
3	Vortexer les RapidSpheres™. REMARQUE: Les particules doivent paraître uniformément dispersées.	30 secondes	
4	Charger le carrousel.	Suivre les instructions affichées à l'écran	
	Démarrer le protocole.	Appuyer sur le bouton "Run"	
5	Décharger le carrousel lorsque l'isolation est terminée.	Les cellules isolées sont prêtes à être utilisées	

Notes et Recommandations

ÉVALUATION DE LA PURETÉ

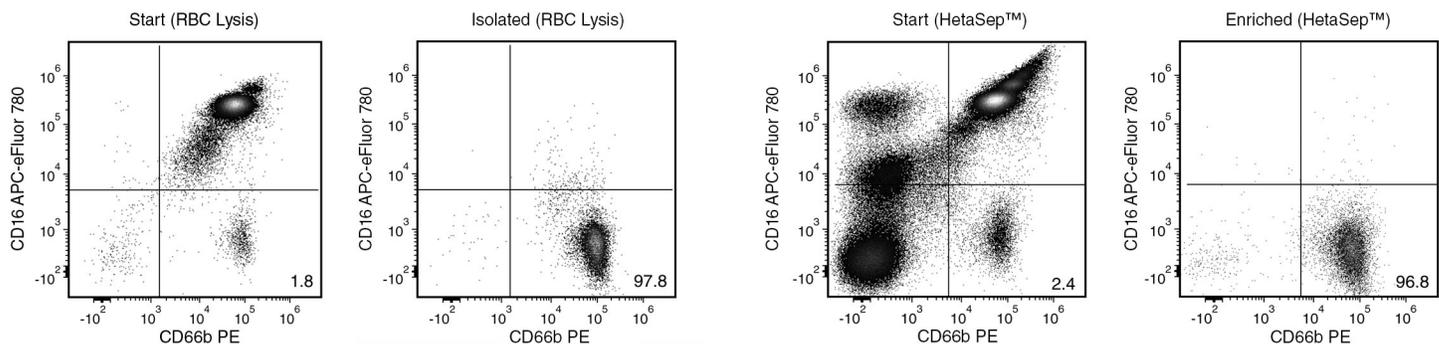
Pour évaluer la pureté des éosinophiles par cytométrie en flux, utiliser les clones d'anticorps conjugués à des fluorochromes suivants:

- Anticorps Anti-Human CD16, Clone 3G8 (n° de catalogue 60041), et
- Anticorps Anti-Human CD66b, Clone G10F5 (n° de catalogue 60086)
- Anticorps Anti-Human CD45, Clone HI30 (n° de catalogue; optionel)

REMARQUE: Les éosinophiles sont CD16-CD66b+ et présentent une faible diffusion avant (FSC) mais une forte diffusion latérale (SSC).

Alternativement, la pureté peut être évaluée en effectuant une cyto-centrifugation sur les cellules enrichies suivie d'une coloration de Wright ou de May-Grunwald (par exemple, Catalogue Sigma #W0625 ou #205435, respectivement).

Données



À partir de sang total préparé en utilisant la lyse des globules rouges ou HetaSep™, le contenu en éosinophiles (CD16-CD66b+CD45+) de la fraction isolée est typiquement de 96,5 ± 2,5% (moyenne ± écart-type en utilisant l'aimant EasySep™ violet). Dans les exemples ci-dessus, les puretés des fractions initiales et finales préparées en utilisant la lyse des globules rouges sont respectivement de 1,8% et 97,8% (parmi les cellules CD45+), et lorsque préparées en utilisant HetaSep™, les puretés sont de 2,4% et 96,8% (parmi les cellules CD45+), respectivement.

LES PRODUITS SONT DESTINÉS UNIQUEMENT À LA RECHERCHE ET NE SONT PAS CONÇUS POUR ÊTRE UTILISÉS À DES FIN DIAGNOSTIQUES OU THERAPEUTIQUES HUMAINS OU ANIMAUX, SAUF INDICATION CONTRAIRE. POUR PLUS D'INFORMATIONS SUR LA QUALITÉ CHEZ STEMCELL, CONSULTEZ WWW.STEMCELL.COM/COMPLIANCE.

Copyright © 2024 de STEMCELL Technologies Inc. Tous droits réservés, y compris les graphiques et images. STEMCELL Technologies & Design, STEMCELL Shield Design, Scientists Helping Scientists, EasyEight, EasySep, HetaSep, RapidSpheres, RoboSep et SepMate sont des marques commerciales de STEMCELL Technologies Inc. Lymphoprep est une marque commerciale de Serumwerk Bernburg AG. Les produits vendus sous la marque Lymphoprep sont également fabriqués par Serumwerk Bernburg AG. Toutes les autres marques commerciales appartiennent à leurs détenteurs respectifs. Bien que STEMCELL ait déployé tous les efforts raisonnables pour s'assurer que les informations fournies par STEMCELL et ses fournisseurs soient correctes, la société ne donne aucune garantie ni déclaration quant à l'exhaustivité de ces informations.