

## EasySep™小鼠 TIL (CD45) 正选试剂盒

可处理  $1 \times 10^9$  个细胞

产品号 #100-0350

正选

文档号 #1000032509 | 版本00



Scientists Helping Scientists™ | WWW.STEMCELL.COM

电话: 400 885 9050

E-MAIL: INFO.CN@STEMCELL.COM

### 产品介绍

通过免疫磁珠正选分离高纯度的CD45+肿瘤浸润白细胞 (TIL)。试剂盒已针对小鼠实体肿瘤的单细胞悬液进行了优化, 包括将4T1、B16-F10和CT26.WT细胞系植入同品系小鼠来诱导的肿瘤。由于不同小鼠肿瘤的异质性, 该试剂盒可能需要优化。

- 操作简单、快捷, 且无需分离柱
- 针对肿瘤和CD45起始占比低的组织样本进行了优化
- 实验方法可灵活调整以实现更高的纯度或回收率

该试剂盒通过识别CD45表面标志物的抗体来正选CD45+细胞。目的细胞用抗体和磁珠标记, 并通过 EasySep™ 磁极进行无柱分选。非目的细胞通过简单倾倒弃去, 而目的细胞则保留在试管中。分选后的细胞可立即用于下游应用, 例如流式细胞术、培养以及基于细胞的实验。

### 包含组分

组分名称	组分号#	规格	储存方式	效期	成分
EasySep™小鼠TIL (CD45) 正选抗体混合物组分A	300-0145	1 x 0.25 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。
EasySep™小鼠TIL (CD45) 正选抗体混合物组分B	300-0146	1 x 0.25 mL	2 - 8°C 储存。 勿冷冻	具体效期请见标签。	保存在含5% HPCD的PBS中的单克隆抗体混合物。
EasySep™小鼠TIL (CD45) 正选抗体混合物组分C	300-0147	1 x 1.5 mL	2 - 8°C 储存。 勿冷冻	具体效期请见标签。	可提高分选抗体性能的溶液。
EasySep™ Dextran RapidSpheres™ 50100磁珠	50100	2 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。

BSA - 牛血清白蛋白; HPCD - 2 - 羟丙基-β-环糊精; 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。

## 样本制备

以下方案是从乳腺癌 (4T1)、黑色素瘤 (B16-F10) 和结肠癌 (CT26.WT) 小鼠模型的实体瘤中制备单细胞悬液的示例, 但也可能适用于其他多种组织。

### 肿瘤组织

以下说明适用于处理 ≤ 1 g 的肿瘤组织。对于 > 1 g 的肿瘤组织, 消化液体积需相应调整。

1. 按以下方法制备 5 mL 肿瘤组织消化液:

- 500 μL 胶原酶/透明质酸酶溶液 (产品号 #07912)
  - 750 μL DNase I 溶液 (1 mg/mL, 产品号 #07900)
  - 3.75 mL RPMI 1640 培养基 (产品号 #36750)
- 充分混合并预热至室温 (15 - 25°C)。

2. 收集肿瘤组织并放入培养皿 (如产品号 #27100)。

3. 使用刀片、手术刀或剪刀将肿瘤组织切碎成小块 (≤ 2 mm)。

4. 将切碎的肿瘤组织转移至含有肿瘤消化液 (按步骤 1 制备) 的 14 mL 圆底试管 (例如产品号 #38008) 中。

5. 在 37°C 摇床上孵育 25 分钟。

6. 将 70 μm 尼龙滤筛 (例如产品号 #27260) 放置在 50 mL 锥形管 (例如产品号 #38010) 上, 用推荐的缓冲液润湿滤筛。将消化的肿瘤组织转移到滤筛中。

用注射器活塞的橡胶端将消化的肿瘤组织推过滤筛。用推荐的缓冲液冲洗滤筛, 然后用推荐的缓冲液加满锥形管至 50 mL。

7. 在室温下以 300 x g 离心 10 分钟 (刹车设置为低)。小心地弃去上清。

8. 将 10 mL 氯化铵溶液 (产品号 #07800) 添加到细胞沉淀中。在室温下孵育 5 分钟。

9. 用推荐缓冲液定容至 50 mL。在室温下以 300 x g 离心 10 分钟 (刹车设置为低)。小心地弃去上清。将细胞以  $5 \times 10^7$  细胞/mL 的浓度重悬于推荐的缓冲液中。

注: 如需获得更高的 TIL 纯度, 请用推荐的缓冲液以  $5 - 10 \times 10^7$  细胞/mL 重悬细胞; 如需获得更高的 TIL 回收率, 请用推荐的缓冲液以  $1 - 2.5 \times 10^7$  细胞/mL 重悬细胞。



## 推荐缓冲液

EasySep™ 缓冲液 (产品号 #20144) 或含 2% 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™小鼠TIL (CD45) 正选试剂盒操作流程

		EASYSEPTM 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。	5 x 10 <sup>7</sup> 细胞/mL 0.1 - 1.5 mL 注：如需获得更高的纯度，建议使用5 - 10 x 10 <sup>7</sup> 细胞/mL。 如需获得更高的回收率，建议使用1 - 2.5 x 10 <sup>7</sup> 细胞/mL。	5 x 10 <sup>7</sup> 细胞/mL 0.5 - 8 mL 注：如需获得更高的纯度，建议使用5 - 10 x 10 <sup>7</sup> 细胞/mL。 如需获得更高的回收率，建议使用1 - 2.5 x 10 <sup>7</sup> 细胞/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	在试管中制备分选抗体混合物。对于每1 mL样本，需制备100 μL抗体混合物 (12.5 μL组分A + 12.5 μL组分B + 75 μL组分C)。	制备分选抗体混合物。 注：分选抗体混合物必须每次现用现配。	制备分选抗体混合物。 注：分选抗体混合物必须每次现用现配。
3	在样本中加入分选抗体混合物。	100 μL/mL 样本	100 μL/mL 样本
	混匀并孵育。	室温孵育5分钟	室温孵育5分钟
4	涡旋振荡RapidSpheres™磁珠。 注意：磁珠应呈均匀分散状态。	30 秒	30 秒
5	将RapidSpheres™磁珠加到样本中。	50 μL/mL 样本	50 μL/mL 样本
	混匀并孵育。	室温孵育3分钟	室温孵育3分钟
6	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	· 若样本 < 3 mL，定容至 5 mL · 若样本 ≥ 3 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
7	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。从磁极上取下试管；试管中含有 分选后的细胞。	弃去上清液	弃去上清液
8	重复以上步骤。	重复三次步骤6和7 (总共进行4次5分钟的分选)	重复三次步骤6和7 (总共进行4次5分钟的分选)
9	将细胞重悬于所需培养基中。请确保从试管壁上收集 细胞。	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，然后恢复直立。不要摇晃或擦拭掉仍可能挂在管口的任何液滴。

表2.EasySep™小鼠TIL (CD45) 正选试剂盒操作流程

		EASYSEP™磁极	
步骤	说明	EasyEights™ (产品号 #18103)	
		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。	5 x 10 <sup>7</sup> 细胞/mL 0.1 - 1.5 mL 注：如需获得更高的纯度，建议使用5 - 10 x 10 <sup>7</sup> 细胞/mL。 如需获得更高的回收率，建议使用1 - 2.5 x 10 <sup>7</sup> 细胞/mL。	5 x 10 <sup>7</sup> 细胞/mL 0.5 - 8 mL 注：如需获得更高的纯度，建议使用5 - 10 x 10 <sup>7</sup> 细胞/mL。 如需获得更高的回收率，建议使用1 - 2.5 x 10 <sup>7</sup> 细胞/mL。
	将样本添加到所需的试管或孔板中。	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	在试管中制备分选抗体混合物。对于每1 mL样本，需制备100 μL抗体混合物 (12.5 μL组分A + 12.5 μL组分B + 75 μL组分C)。	制备分选抗体混合物。 注：分选抗体混合物必须每次现用现配。	制备分选抗体混合物。 注：分选抗体混合物必须每次现用现配。
3	在样本中加入分选抗体混合物。	100 μL/mL 样本	100 μL/mL 样本
	混匀并孵育。	室温孵育3分钟	室温孵育3分钟
4	涡旋振荡RapidSpheres™磁珠。 注意：磁珠应呈均匀分散状态。	30 秒	30 秒
5	将RapidSpheres™磁珠加到样本中。	100 μL/mL 样本	100 μL/mL 样本
	混匀并孵育。	室温孵育3分钟	室温孵育3分钟
6	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	· 若样本 < 3 mL，定容至 5 mL · 若样本 ≥ 3 mL，定容至10 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
7	小心地吸取**（切勿倾倒）上清液。 从磁极中取出含有目的细胞的试管。	弃去上清液	弃去上清液
8	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	· 若样本 < 3 mL，定容至 5 mL · 若样本 ≥ 3 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
9	小心地吸取**（切勿倾倒）上清液。 从磁极中取出含有目的细胞的试管。	弃去上清液	弃去上清液
10	重复以上步骤。	再重复两次步骤8和9 (总共进行1次10分钟和3次5分钟的分选)	再重复两次步骤8和9 (总共进行1次10分钟和3次5分钟的分选)
11	将细胞重悬于所需培养基中。 请确保从试管壁上收集细胞。	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])。

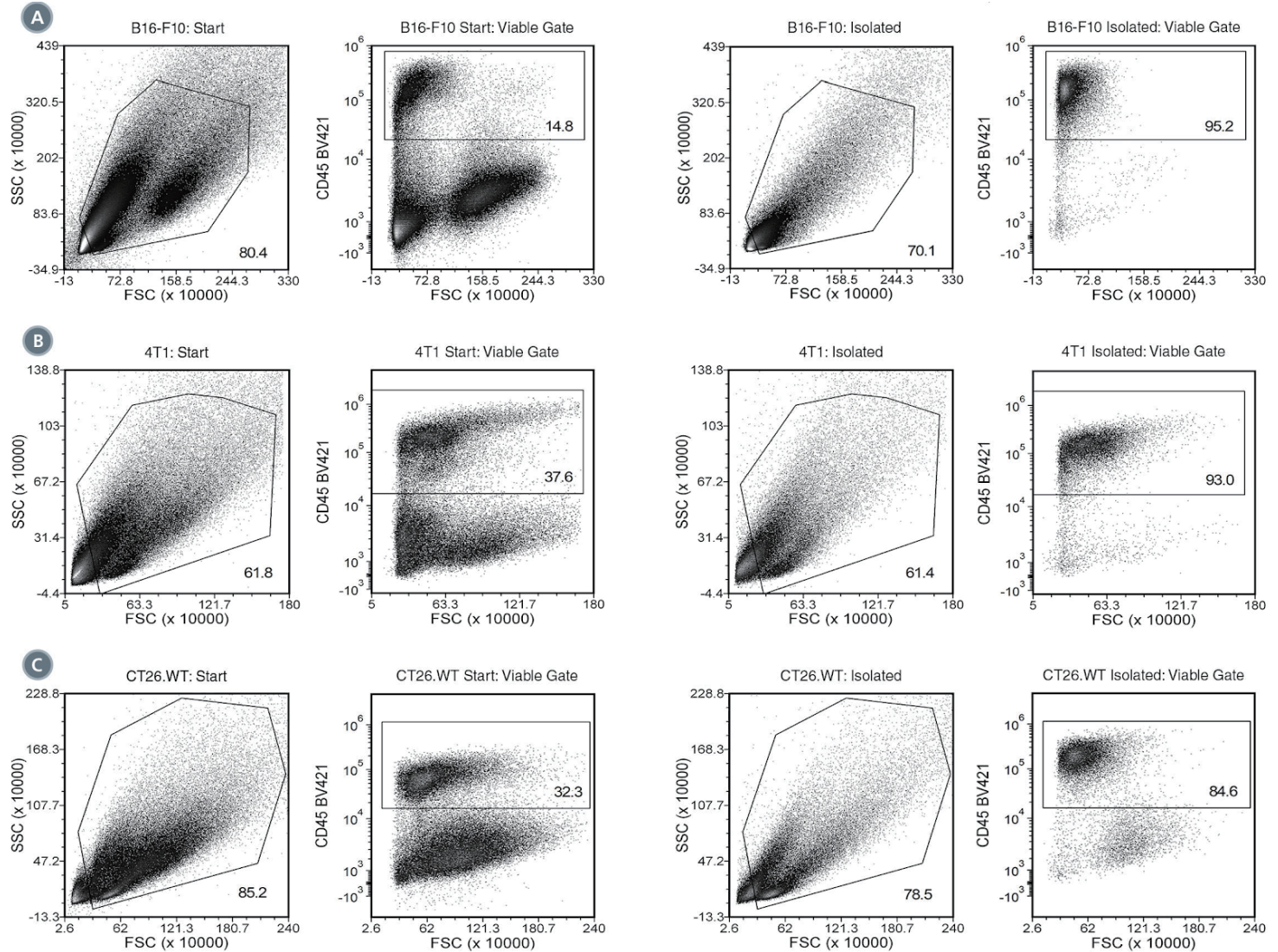
## 注意事项和提示

### 纯度评估

要通过流式细胞术评估细胞纯度，请使用以下克隆号的流式抗体之一：

- 抗小鼠CD45，克隆30-F11（产品号 #60030；可能被部分阻断），适用于所有小鼠品系，或者
- 抗小鼠CD45.2，克隆号104（产品号 #60118），适用于携带 CD45.2 或 Ly5.2 的小鼠品系（如A, AKR, BALB/c, CBA/Ca, CBA/J, C3H/He, C57BL, C57BR, C57L, C58, DBA/1, DBA/2, NZB, SWR, 和129），或者
- 抗小鼠CD45.1，克隆号A20（产品号 #60117），适用于携带 CD45.1 或 Ly5.1 的小鼠品系(如 RIII, SJL/J, STS/A, 以及DA)

## 实验数据



使用B16-F10、4T1或CT26.WT细胞系诱导为肿瘤并将肿瘤解离成单细胞悬液。使用紫色EasySep™磁极从不同起始细胞浓度的单细胞悬液中分离出CD45+ TIL。

(A) 起始样本为  $1 \times 10^8$  细胞/mL 的B16-F10肿瘤单细胞悬液，起始和最终分选后的纯度分别为14.8%和95.2%。

(B) 起始样本为  $4 \times 10^7$  细胞/mL 的4T1肿瘤单细胞悬液，起始和最终分选后的纯度分别为 37.6% 和 93.0%。

(C) 起始样本为  $2.5 \times 10^7$  细胞/mL 的CT26.WT肿瘤单细胞悬液，起始和最终分选后的纯度分别为32.3%和84.6%。

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](http://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、EasyEights、EasySep和RapidSpheres均是STEMCELL Technologies Canada Inc. 的商标。所有商标均为各自所有者所有。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。