

EasySep™人记忆B细胞分选试剂盒

可处理 2×10^9 个细胞

产品号 #17864

正选

文档号 #1000035708 | 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, 从新鲜或冻存的人外周血单个核细胞 (PBMCs) 或白细胞单采术样本中分离出高纯度的记忆B细胞。

- 在40分钟内分离出高纯度的人记忆B细胞
- 无需清洗即可去除EasySep™ Releasable RapidSpheres™可解离磁珠
- 可额外从同一样本中分离不带磁珠标记的naïve B细胞

首先, 通过使用抗体复合物和EasySep™ Releasable RapidSpheres™的免疫磁珠无柱正选来分离CD27+细胞。接着, 从使用EasySep™分离的CD27+细胞中去除结合的磁珠, 并通过抗体复合物和EasySep™ Dextran RapidSpheres™去除非B细胞。最终分选后的细胞中含有高纯度的CD27+记忆B细胞, 可立即用于下游应用。也可同时分离naïve B细胞以进行功能性研究。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它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CD27正选抗体混合物	17864C	1 x 1 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™人记忆B细胞预富集抗体混合物	17454C	2 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磁珠	50201	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。
EasySep™ Dextran RapidSpheres™ 50103磁珠	50103	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。
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™磁珠的缓冲液。

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。

样本制备

有关可用的新鲜和冻存样本, 请参见 www.stemcell.com/primarycells。

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。

如果使用冻存的PBMCs, 在室温 (15 - 25°C) 下用终浓度为100 µg/mL的DNase I溶液 (产品号 #07900) 孵育细胞至少15分钟, 再进行标记和分选。使用37 µm的细胞滤筛 (产品号 #27215) 过滤细胞悬液去除聚团, 以获得最佳结果。

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. 可选步骤（用于血小板去除）：
 - 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™人记忆B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	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 0.5 - 1 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CD27正选抗体混合物。 注意：不要涡旋抗体混合物。	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
3	涡旋Releasable RapidSpheres™磁珠。 注意：磁珠应呈均匀分散状态。	30 秒	30 秒
	将Releasable RapidSpheres™磁珠加到样本中并混匀。	100 µL/mL 样本	100 µL/mL 样本
4	在样本中加入记忆B细胞预富集抗体混合物。 注意：不要涡旋抗体混合物。	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
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*， 倾倒入上清液至一个新的试管中。	使用新的5 mL流式管 如果需要，可保留上清液用于分离naive B细胞（表3）	使用新的14 mL流式管 如果需要，可保留上清液用于分离naive B细胞（表3）
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。	再重复两次步骤7和8 (总共进行1次5分钟和3次3分钟的分选)	再重复两次步骤7和8 (总共进行1次5分钟和3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

		EASYSEPTM磁极	
步骤	说明 (续)	 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。	与起始样本体积相同 (即：与步骤1中使用的体积相同)	与起始样本体积相同 (即：与步骤1中使用的体积相同)
11	在样本中加入Release缓冲液。	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
12	涡旋Dextran RapidSpheres™磁珠。 注意：磁珠应呈均匀分散状态。	30 秒	30 秒
	将Dextran RapidSpheres™磁珠加到样本中混匀	50 µL/mL 样本 不进行孵育，立即进行下一步骤	50 µL/mL 样本 不进行孵育，立即进行下一步骤
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"> ●若起始样本 < 4 mL，定容至 5 mL ●若起始样本 ≥ 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
14	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
15	从磁极中取出试管，然后将新试管（不加盖）放入磁极中孵育以进行第二次分选。	室温孵育1分钟	室温孵育1分钟
16	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	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。不要摇晃或者擦拭掉仍可能挂在管口的任何液滴。

表2.EasySep™人记忆B细胞分选试剂盒操作流程

		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 0.5 - 1 mL	1 x 10 ⁸ 细胞/mL 0.5 - 6 mL	1 x 10 ⁸ 细胞/mL 10 - 25 mL	
	将样本添加到所需的试管中。	5 mL (12 x 75 mm) 流式管 (例如产品号 #38007)	14 mL (17 x 95 mm) 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CD27正选抗体混合物。	50 µL/mL 样本	50 µL/mL 样本	50 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™磁珠。 注意：磁珠应呈均匀分散状态	30 秒	30 秒	30 秒	
	将Releasable RapidSpheres™磁珠加到样本中并混匀	100 µL/mL 样本	100 µL/mL 样本	100 µL/mL 样本	
4	在样本中加入记忆B细胞预富集抗体混合物。 注意：不要涡旋抗体混合物。	100 µL/mL 样本	100 µL/mL 样本	90 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	小心地吸出**（切勿倾倒）上清液至一个新的试管。	使用新的5 mL管 如果需要，可保留上清液用于分离 naïve B细胞（表4）	使用新的14 mL管 如果需要，可保留上清液用于分离 naïve B细胞（表4）	使用新的50 mL管 如果需要，可保留上清液用于分离 naïve B细胞（表4）	
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 	<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	
8	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	
9	重复以上步骤。	重复两次步骤7和8 (总共进行4次10分钟的分选)	重复两次步骤7和8 (总共进行4次10分钟的分选)	重复两次步骤7和8 (总共进行4次10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	继续步骤10，下一页	



		EASYSEPTM磁极		
步骤	说明 (续)	EasyEights™ (产品号 #18103)		Easy 50 (产品号 #18002)
		5 mL 流式管	14 mL 流式管	
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。	与起始样本体积相同 (即: 与步骤1中使用的体积相同)	与起始样本体积相同 (即: 与步骤1中使用的体积相同)	与起始样本体积相同 (即: 与步骤1中使用的体积相同)
11	在样本中加入Release缓冲液。	100 µL/mL 样本	100 µL/mL 样本	100 µL/mL 样本
	在样本中加入记忆B细胞预富集抗体混合物。 注意: 不要涡旋抗体混合物。	---	---	10 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
12	涡旋Dextran RapidSpheres™磁珠。 注意: 磁珠应呈均匀分散状态	30 秒	30 秒	30 秒
13	将Dextran RapidSpheres™磁珠加到样本中。	50 µL/mL 样本	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	室温孵育3分钟
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 	<ul style="list-style-type: none"> ●若样本 ≤ 10 mL, 定容至 20 mL ●若样本 > 10 mL, 定容至 40 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
15	小心地吸出** (切勿倾倒) 富集的细胞悬液至一个新的试管。	使用新的5 mL管	使用新的14 mL管	使用新的50 mL管
16	从磁极中取出试管, 然后将新试管 (不加盖) 放入磁极中孵育以进行第二次分选。	室温孵育10分钟	室温孵育10分钟	室温孵育10分钟
17	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富集的细胞悬液 (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])。

在手动进行EasySep™人记忆B细胞分选方案的步骤6后（参见表1和2），可以进一步富集上清液以获得naïve B细胞（CD19+CD27-）。有关每种磁极的详细使用方法，请参阅表3和表4。

表3.可选：Naïve B细胞富集操作流程

		EASYSEP™ 磁极	
步骤	说明	 EasySep™ (产品号 #18000)	 “The Big Easy” (产品号 #18001)
1	确保细胞在所需的试管中。	表1第6步中的上清液必须置于5 mL (12 x 75 mm) 聚苯乙烯流式管中 (例如产品号 #38007)	表1第6步中的上清液必须置于14 mL (17 x 95 mm) 聚苯乙烯流式管中 (例如产品号 #38008)
2	涡旋Dextran RapidSpheres™磁珠。 注意：磁珠应呈均匀分散状态	30 秒	30 秒
	将Dextran RapidSpheres™磁珠加到样本中混匀。	50 µL/mL的起始样本体积 (参见表1, 步骤1) 无需孵育, 立即进行下一步	50 µL/mL的起始样本体积 (参见表1, 步骤1) 无需孵育, 立即进行下一步
3	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
4	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	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。不要摇晃或者擦拭掉仍可能挂在管口的任何液滴。

表4.可选：Naïve B细胞富集操作流程

		EASYSEP™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	确保细胞在所需的试管中。	表2第6步中的上清液必须置于5 mL (12 x 75 mm) 聚苯乙烯流式管中 (例如产品号 #38007)	表2第6步中的上清液必须置于14 mL (17 x 95 mm) 聚苯乙烯流式管中 (例如产品号 #38008)	表2第6步中的上清液必须置于50 mL (30 x 115 mm) 锥形管中 (例如产品号 #38010)
2	涡旋Dextran RapidSpheres™磁珠。 注意：磁珠应呈均匀分散状态	30 秒	30 秒	30 秒
3	将Dextran RapidSpheres™磁珠加到样本中。	50 µL/mL的起始样本体积 (参见表2, 步骤1)	50 µL/mL的起始样本体积 (参见表2, 步骤1)	50 µL/mL的起始样本体积 (参见表2, 步骤1)
	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
4	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
5	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

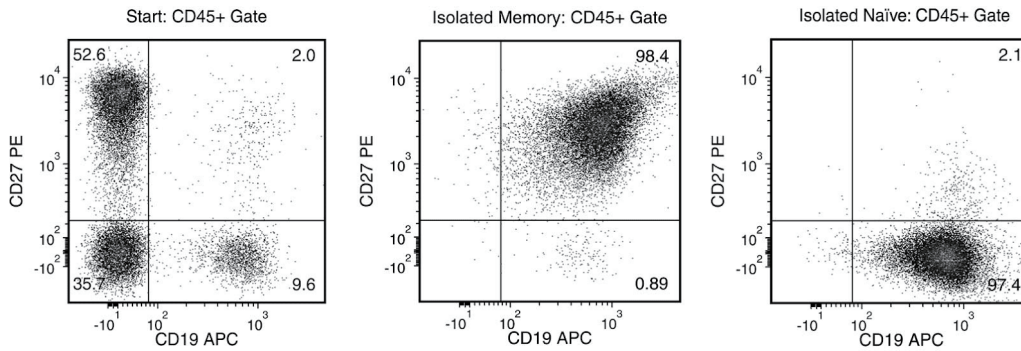
纯度评估

要通过流式细胞术评估CD19+CD27+细胞的纯度，请使用以下克隆号的荧光偶联抗体：

- 抗人CD19抗体，克隆号HIB19（产品号 #60005），和
- 抗人CD45抗体，克隆HI30（产品号 #60018）或克隆2D1（产品号 #60123），以及
- 抗小鼠CD27抗体，克隆LG.3A10（产品号 #60160），与人CD27有交叉反应

注意：在使用Brilliant Violet™偶联抗体进行流式细胞仪或荧光显微镜分析之前，需要在EasySep™ Release分选的细胞上滴定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。

实验数据



起始样本为人PBMCs，分选后的记忆B细胞（CD19+CD27+）含量通常为 $97 \pm 2\%$ （平均值 \pm 标准差，使用紫色EasySep™磁极）。使用可选方案，分选后的naïve B细胞含量（CD19+CD27-）通常为 $93 \pm 5\%$ （平均值 \pm 标准差）。

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和其设计及徽标，以及Scientists Helping Scientists、EasyEights、EasySep、RapidSpheres和SepMate均是STEMCELL Technologies Canada Inc.的商标。Brilliant Violet是Sirigen Group Ltd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。其它商标为各自持有人的产权。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。