

# EasySep™ Release 人 CD45 正选试剂盒

可处理 1 x 10<sup>9</sup> 个细胞

产品号 #100 - 0105

产品号 #100 - 0108 RoboSep™

产品号 #100 - 0107 (用于人源化小鼠)

产品号 #100 - 0109 RoboSep™ (用于人源化小鼠)

正选

文档号 #1000035709 | 版本00



Scientists Helping Scientists™ | WWW.STEMCELL.COM

电话: 400 885 9050

E-MAIL: INFO.CN@STEMCELL.COM

## 产品介绍

来自人的原代组织和肿瘤 (产品号 #100 - 0105) 或人源化小鼠组织和肿瘤异种移植 (产品号 #100 - 0107) 的单细胞悬液中分选人CD45+白细胞。

- 在45分钟内获得高纯度的人CD45+白细胞和肿瘤浸润白细胞 (TIL)
- 无需清洗即可去除EasySep™ Releasable RapidSpheres™

该试剂盒使用识别CD45表面标志物的抗体和EasySep™ Releasable RapidSpheres™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。随后, 结合在使用EasySep™分离的CD45+细胞上的磁珠被解离, 这些细胞可立即用于下游应用, 例如流式细胞术、细胞培养或DNA/RNA提取。

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™ Release人CD45正选抗体混合物	300 - 0046	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。
EasySep™ Releasable RapidSpheres™ 50201	50201	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 (浓缩)	20165	6 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。
EasySep™ 小鼠FcR阻断剂*	18731	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和< 0.1% 叠氮化钠的PBS中的单克隆抗体。

BSA - 牛血清白蛋白; PBS - 磷酸盐缓冲液

\*仅在购买用于人源化小鼠的EasySep™ Release 人CD45正选试剂盒 (产品号 #100 - 0107) 和用于人源化小鼠的RoboSep™ Release 人CD45 正选试剂盒 (产品号 #100 - 0109) 时提供。

试剂盒组分可在室温 (15 - 25°C) 下运输, 但收到后应按照上表中的储存条件储存。

EasySep™ EasyTube™ - 14 (产品号 #20128) 将随RoboSep™ Release 人CD45正选试剂盒 (产品号 #100 - 0108) 和用于人源化小鼠的RoboSep™ Release 人CD45正选试剂盒 (产品号 #100 - 0109) 一起提供, 以获得最佳的自动分选效果。进行手动分选时, 不需要使用EasySep™ EasyTube™ - 14。

## 样本制备

制备单细胞悬液以备细胞分选。组织解离方法需要经过优化以达到最佳的细胞活率和得率。以下示例是从人乳腺癌肿瘤异种移植体（MDA-MB-231）制备单细胞悬液的方法，但也可能适用于各种其他组织。

### 人肿瘤异种植物

#### 1. 制备肿瘤消化液。

以下示例是制备5 mL肿瘤消化液的方法，适用于≤1 g 切碎的肿瘤组织。对于> 1 g切碎的肿瘤组织，消化液体积需相应调整。

- 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。

#### 2. 收集肿瘤组织并放入35 mm培养皿（如产品号 #27100）。

#### 3. 使用刀片或手术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。注：对于~ 1 g 切碎的肿瘤组织，使用5 mL的肿瘤消化液。对于> 1 g切碎的肿瘤组织，体积需相应调整。

#### 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压过滤筛。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. 将细胞以 $1 \times 10^8$ 细胞/mL 的浓度重悬于推荐的缓冲液中。

注：对于红细胞（RBC）含量高的样本，建议使用氯化铵溶液（产品号 #07800）进行裂解。



## 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<sup>++</sup>和Mg<sup>++</sup>。

## 使用指南 – EasySep™ 手动实验流程

请参阅第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™ Release 人 CD45 正选试剂盒或用于人源化小鼠的EasySep™ Release 人 CD45 正选试剂盒操作流程




步骤	说明	EASYSEPTM 磁极	
		 EasySep™ (产品号 #18000)	 "The Big Easy" (产品号 #18001)
1	稀释Release Buffer (浓缩) 以制备Release Buffer (1X)。	用推荐缓冲液以1: 40稀释。 注: Release buffer (1X) 必须在使用当天制备。 请参阅步骤10和13了解所需的体积。	用推荐缓冲液以1: 40稀释。 注: Release buffer (1X) 必须在使用当天制备。 请参阅步骤10和13了解所需的体积。
2	按指定细胞浓度制备样本，样本体积在范围内。	1 x 10 <sup>8</sup> 细胞/mL 0.1 - 2 mL	1 x 10 <sup>8</sup> 细胞/mL 0.25 - 8 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)
3	如果从人样本 (产品号 #100 - 0105) 中分离细胞， 请直接进行步骤4。 或 如果从人源化小鼠 (产品号 #100 - 0107) 中分离细胞， 请在样本中FcR阻断剂。	10 µL/mL 样本	10 µL/mL 样本
4	在样本中加入分选抗体混合物。注意: 请勿涡旋抗体混合物。	50 µL/mL 样本	50 µL/mL 样本
	混匀并孵育。	室温孵育5分钟	室温孵育5分钟
5	涡旋Releasable RapidSpheres™。 注意: 磁珠应呈均匀分散状态。	30 秒	30 秒
6	将Releasable RapidSpheres™ 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
7	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 ≤ 4 mL，定容至5 mL</li> <li>●若样本 &gt; 4 mL，定容至10 mL</li> </ul>
	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
	继续步骤9，下一页	继续步骤9，下一页	继续步骤9，下一页




		EASYSEP™ 磁极	
步骤	说明 (接上页)	 EasySep™ (产品号 #18000)	“The Big Easy” (产品号 #18001) 
9	重复以上步骤。	重复三次步骤7和8 (总共进行4次5分钟的分选)	重复三次步骤7和8 (总共进行4次5分钟的分选)
10	添加Release buffer (1X), 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 ≤ 4 mL, 定容至5 mL</li> <li>● 若样本 &gt; 4 mL, 定容至10 mL</li> </ul>
	孵育。	室温孵育3分钟	室温孵育3分钟
11	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
12	拿起磁极, 以一个连续的动作翻转磁极和试管**, 倾倒下清液至一个新的试管中并置于一旁。	使用新的14 mL 试管 注: 分选后的细胞 (在新试管中) 将与步骤15中倒出的细胞合并	使用新的14 mL 试管 注: 分选后的细胞 (在新试管中) 将与步骤15中倒出的细胞合并
13	从磁极中取出试管, 并使用Release buffer (1X) 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 ≤ 4 mL, 定容至5 mL</li> <li>● 若样本 &gt; 4 mL, 定容至10 mL</li> </ul>
14	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**, 倾倒下清液至一个新的试管中。	与步骤12中倒出的细胞悬液合并, 分选后的细胞可立即用于下游应用	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 对于 ≤ 4 mL 的起始样本, 使用新的14 mL试管</li> <li>● 对于 &gt; 4 mL 的起始样本, 使用新的50 mL锥形管。</li> </ul> 与步骤12中倒出的细胞悬液合并 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™ Release人 CD45 正选试剂盒或用于人源化小鼠的EasySep™ Release人 CD45 正选试剂盒操作流程

步骤	说明	EASYSEPTM 磁极		
		EasyPlate™ (产品号 #18102)	EasyEights™ (产品号 #18103)	
				
			5 mL 流式管	14 mL 流式管
1	稀释Release Buffer (浓缩) 以制备Release Buffer (1X)。	用推荐缓冲液以1: 40稀释。 注: Release buffer (1X) 必须在使用当天制备。 请参阅步骤10和13了解所需的体积。	用推荐缓冲液以1: 40稀释。 注: Release buffer (1X) 必须在使用当天制备。 请参阅步骤10和13了解所需的体积。	用推荐缓冲液以1: 40稀释。 注: Release buffer (1X) 必须在使用当天制备。 请参阅步骤10和13了解所需的体积。
2	按指定细胞浓度制备样本, 样本体积在范围内。	1 x 10 <sup>8</sup> 细胞/mL 0.05 - 0.2 mL	1 x 10 <sup>8</sup> 细胞/mL 0.1 - 2 mL	1 x 10 <sup>8</sup> 细胞/mL 0.25 - 8 mL
	将样本添加到所需的试管中(若使用EasyPlate™ EasySep™ 磁极, 将样本加到96孔板中)。	圆底, 非TC处理的96孔板 (如: 产品号 #38018)	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)
3	如果从人样本 (产品号 #100 - 0105) 中分离细胞, 请直接进行步骤4。 或 如果从人源化小鼠 (产品号 # 100 - 0107) 中分离细胞, 请在样本中添加FcR 阻断剂。	10 μL/mL 样本	10 μL/mL 样本	10 μL/mL 样本
4	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
	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	涡旋Releasable RapidSpheres™。 注意: 磁珠应呈均匀分散状态	30 秒	30 秒	30 秒
6	将Releasable RapidSpheres™ 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
7	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0.25 mL	定容至2.5 mL	<ul style="list-style-type: none"> <li>●若样本 ≤ 4 mL, 定容至5 mL</li> <li>●若样本 &gt; 4 mL, 定容至10 mL</li> </ul>
	将试管或孔板 (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5分钟
8	小心地吸出*** (切勿倾倒) 上清液。 从磁极中取出含有分选后的细胞的试管或孔板。	弃去上清液	弃去上清液	弃去上清液
	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

		EASYSEPT™磁极		
步骤	说明 (续)	 EasyPlate™ (产品号 #18102)	EasyEights™ (产品号 #18103)	
			 5 mL 流式管	14 mL 流式管 
9	重复以上步骤。	重复三次步骤7和8 (总共进行4次5分钟的分选)	重复三次步骤7和8 (总共进行4次5分钟的分选)	重复三次步骤7和8 (总共进行4次5分钟的分选)
10	添加Release buffer (1X), 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0.25 mL	定容至2.5 mL	<ul style="list-style-type: none"> <li>●若样本 ≤ 4 mL, 定容至5 mL</li> <li>●若样本 &gt; 4 mL, 定容至10 mL</li> </ul>
	孵育。	室温孵育3分钟	室温孵育3分钟	室温孵育3分钟
11	将试管或孔板 (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5分钟
12	小心地吸出*** (切勿倾倒) 上清液至一个新的试管或孔板中, 并置于一旁。	使用新的96孔板 注: 分选出的细胞 (在新孔板中) 将与步骤15中吸出的细胞合并	使用新的14 mL试管 注: 分选出的细胞 (在新试管中) 将与步骤15中吸出的细胞合并	使用新的14 mL孔板 注: 分选出的细胞 (在新试管中) 将与步骤15中吸出的细胞合并
13	从磁极中取出试管或孔板, 并使用Release buffer (1X) 定容至指定体积。通过轻轻上下吹吸2 - 3次来混匀。	定容至0.25 mL	定容至2.5 mL	<ul style="list-style-type: none"> <li>●若样本 ≤ 4 mL, 定容至5 mL</li> <li>●若样本 &gt; 4 mL, 定容至10 mL</li> </ul>
14	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5分钟
15	小心地吸出*** (切勿倾倒) 分选后的细胞悬液。	与步骤12中吸出的细胞悬液合并 分选后的细胞可立即用于下游应用	与步骤12中吸出的细胞悬液合并 分选后的细胞可立即用于下游应用	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 对于 ≤ 4 mL 的起始样本, 使用新的14 mL试管</li> <li>· 对于 &gt; 4 mL 的起始样本, 使用新的50 mL锥形管</li> </ul> 与步骤12中倒出的细胞悬液合并 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])。

## 使用指南 – RoboSep™ 全自动实验流程

请参阅第2页了解样本制备和推荐缓冲液。有关RoboSep™的详细使用说明，请参阅表3。

表3.RoboSep™ Release人 CD45 正选试剂盒或用于人源化小鼠的EasySep™ Release人 CD45 正选试剂盒操作流程

步骤	说明	RoboSep™ (产品号 #21000)
1	按指定细胞浓度制备样本，样本体积在范围内。	1 x 10 <sup>8</sup> 细胞/mL 0.25 - 8 mL
	将样本添加到所需的试管中。	14mL (17 x 95 mm) 聚苯乙烯流式管 (如: 产品号 #38008)
2	如果从人样本 (产品号 #100 - 0105) 中分离细胞， 请直接进行步骤3。 或 如果从人源化小鼠 (产品号 # 100 - 0107) 中分离细胞， 请在样本中添加FcR阻断剂。	10 µL/mL 样本
3	选择实验程序。	<ul style="list-style-type: none"> <li>●Release人CD45正选 100 - 0105 - 小体积 (&lt; 4 mL)</li> <li>●Release人CD45正选 100 - 0105 - 大体积 (4 - 8 mL)</li> <li>●Release人源化小鼠CD45正选 100 - 0107 - 小体积 (&lt; 4 mL)</li> <li>●Release人源化小鼠CD45正选 100 - 0107 - 大体积 (4 - 8 mL)</li> </ul>
4	涡旋Releasable RapidSpheres™。 注意：磁珠应呈均匀分散状态。	30 秒
5	加载转盘。	根据屏幕上的提示操作 注：当提示放置分选试管时，将EasySep™ EasyTube™ - 14放入磁极中。
	启动实验程序。	按下绿色的“Run (运行)”按钮
6	卸载转盘。	分选后的细胞可立即用于下游应用

## 注意事项和提示

### EASYSEPTM RELEASE BUFFER解离缓冲液

EasySep™ Release Buffer (浓缩) 是40X 浓缩液； Release buffer (1X) 必须在使用当天制备。要制备Release buffer (1X)，请使用推荐缓冲液以1:40的比例进行稀释。

所需体积请参阅表1和表2中的步骤10和13。

### 优化回收率

如需提高回收率，可将表1和表2中步骤7 - 9的分选次数减少至2次5分钟。

### 起始细胞数量低

对于起始样本细胞数较低的情况（例如，表1中紫色EasySep™ 磁极处理的细胞数少于1 x 10<sup>7</sup>），请按步骤2中的最小推荐体积重悬细胞，再进行后续操作。

### 纯度评估

要通过流式细胞术评估人白细胞 (CD45+) 的纯度，请使用以下克隆号的流式抗体：

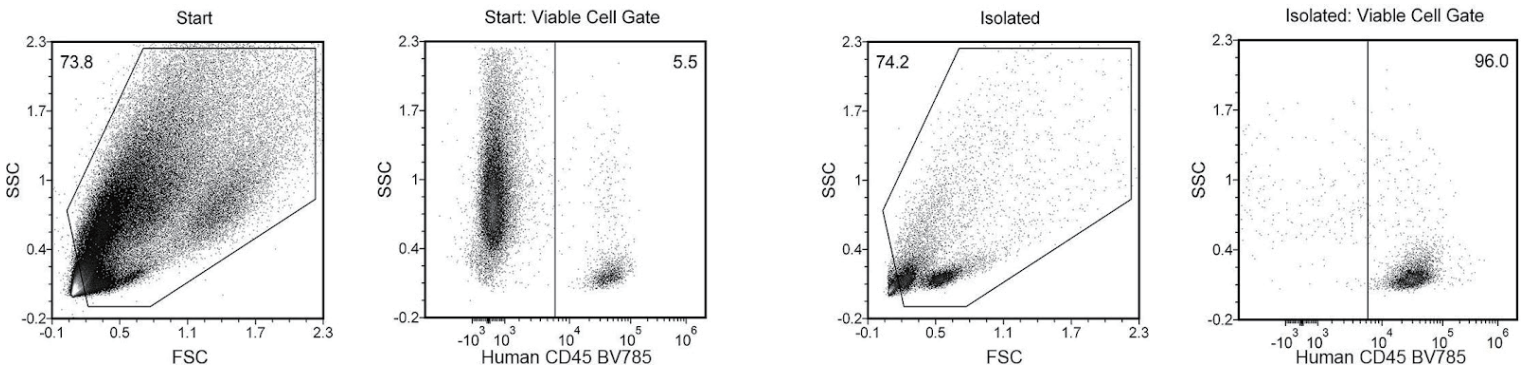
- 抗人CD45抗体，克隆HI30 (产品号 #60018；可能被部分阻断)

注：强烈建议使用细胞活性染料。

注：为了在纯度评估时排除细胞碎片，建议使用细胞核渗透染料DRAQ5™。

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分选的细胞上仔细滴定Brilliant Violet™ 偶联抗体。使用Brilliant Violet™ 偶联进行纯度评估时，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



起始样本为来自NRG-3GS人源化小鼠的人乳腺癌肿瘤异种移植体 (MDA-MB-231) 单细胞悬液，起始样本和最终分选后的CD45+ TIL纯度分别为5.5%和96.0%。

注：结果分析时已经基于DRAQ5™和DAPI荧光排除细胞碎片和死细胞。

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 和其设计及徽标，以及Scientists Helping Scientists、EasyEights、EasyPlate、EasySep、RoboSep和RapidSpheres均是STEMCELL Technologies Canada Inc.的商标。Brilliant Violet是Sirigen Group Ltd的商标。BD Horizon Brilliant是Becton, Dickinson, and Company的商标。DRAQ5是Biostatus, Ltd.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，对此类信息的准确性或完整性不作任何保证或声明。