

EasySep™ Direct 人嗜碱性粒细胞分选试剂盒

可处理 100 mL 全血

产品号 #19667

负选

文档号 #10000035800 | 版本00



Scientists Helping Scientists™ | WWW.STEMCELL.COM

电话: 400 885 9050

E-MAIL: INFO.CN@STEMCELL.COM

产品介绍

通过免疫磁珠负选直接从全血中分离高纯度的嗜碱性粒细胞。

该试剂盒的优势包括:

- 高效去除红细胞, 无需密度梯度离心、沉降或裂解
- 分选获得的细胞纯度高达 98%
- 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嗜碱性粒细胞。非目的细胞用抗体和EasySep™ Direct RapidSpheres™磁珠标记, 并使用EasySep™磁极进行分选。目的细胞可被轻松收集到新试管中, 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 人嗜碱性粒细胞分选抗体混合物	19667 C	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, 包含Fc受体阻断抗体。
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, 但应在收到后立即冷藏。

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

外周血

EDTA 的存在对本试剂盒的使用效果至关重要。使用K2EDTA或K3EDTA作为抗凝剂采集血液。如果使用非EDTA的抗凝剂, 则必须在全血样本中加入终浓度为 3 mM 的EDTA。

为了最佳的回收率, 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

含有 1mM EDTA的PBS。缓冲液应该不含Ca++和Mg++。也可以使用EasySep™缓冲液 (产品号 #20144)。

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信息，请参阅表1和表2。

表1.EasySep™ Direct 人嗜碱性粒细胞分选试剂盒操作流程

		EASYSEP™ 磁极
步骤	说明	“The Big Easy” (产品号 #18001) 
1	制备样本，样本体积在范围内。	2 - 6 mL
	将全血样本添加到所需的试管中。	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
3	在样本中加入分选抗体混合物。	50 µL/mL 样本
4	将RapidSpheres™磁珠加到样本中。	50 µL/mL 样本
5	混匀并孵育。	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。	<ul style="list-style-type: none"> •若样本 < 4 mL, 定容至 10 mL •若样本 ≥ 4 mL, 定容至 12 mL
	将试管（不加盖）放入磁极中并孵育。	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， 倾倒入富集的细胞悬液*至一个新的试管中。	使用新的 14 mL流式管
8	将RapidSpheres™磁珠添加到含有富集细胞的新试管中。	25 µL/mL原始样本体积
	混匀并孵育。	室温孵育 5 分钟
9	从磁极中取出流式管，然后将第 8 步中的新试管（不加盖） 放入磁极中孵育以进行第二次分选。	室温孵育 5 分钟
10	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 14 mL流式管
11	将RapidSpheres™磁珠添加到含有富集细胞的新试管中。	25 µL/mL原始样本体积
	混匀并孵育。	室温孵育 5 分钟
12	从磁极中取出流式管，然后将第 11 步中的新试管（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
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)

* 第一次磁珠分选后，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相似。

** 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 人嗜碱性粒细胞分选试剂盒操作流程

步骤	说明	EASYSEPT™ 磁极	
		EasySep™ (产品号 #18103) 14 mL 流式管	Easy 50 (产品号 #18002)
1	收集样本，样本体积在范围内。	3 - 6 mL	7 - 25 mL
	将全血样本添加到所需的试管中。	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
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。	<ul style="list-style-type: none"> • 若样本 < 4 mL，定容至 10 mL • 若样本 ≥ 4 mL，定容至 12 mL 	定容至原样本体积的两倍
	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 14 mL流式管	使用新的 50 mL锥形管
8	将RapidSpheres™磁珠添加到含有富集细胞的新试管中。	25 µL/mL原始样本体积	25 µL/mL原始样本体积
	混匀并孵育。	室温孵育 5 分钟	室温孵育 5 分钟
9	从磁极中取出流式管，然后将第 8 步中的新试管（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
10	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 14 mL流式管	使用新的 50 mL锥形管
11	将RapidSpheres™磁珠添加到含有富集细胞的新试管中。	25 µL/mL原始样本体积	25 µL/mL原始样本体积
	混匀并孵育。	室温孵育 5 分钟	室温孵育 5 分钟
12	从磁极中取出流式管，然后将第 11 步中的新试管（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
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

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 5 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，在离心后的分选的细胞沉淀中可见残留的红细胞，可使用小体积（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™磁极中进行额外一次 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嗜碱性粒细胞（CD123+ IgE+ 或 CD123+ CD203c low）的纯度，请使用以下克隆号的荧光偶联流式抗体：

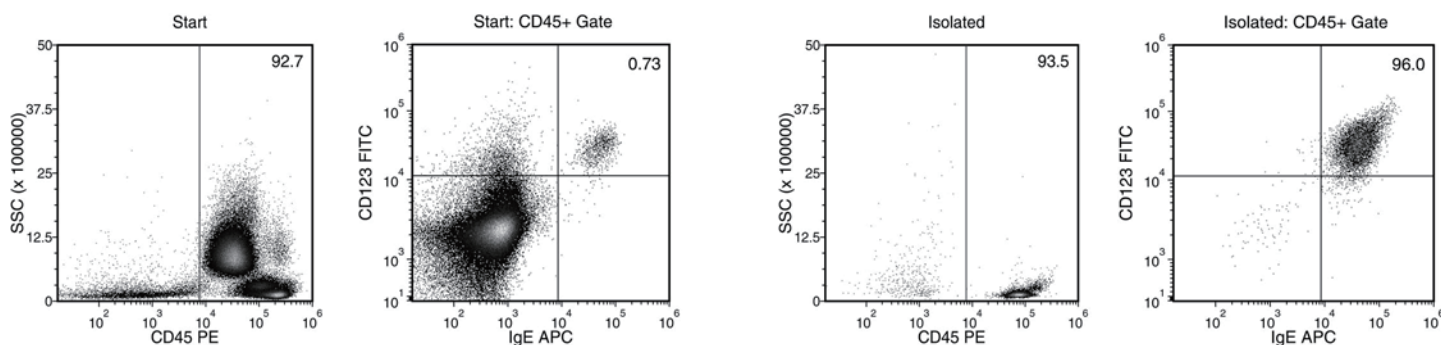
- 抗人CD123 (IL-3R α) 抗体，克隆 6H6（产品号 #60110），以及
- 抗人IgE抗体，或
- 抗人CD203c 抗体

注意：建议在CD45 + 细胞中评估纯度，以排除碎片、血小板和红细胞。如有必要，请加入活性检测染料（例如Propidium Iodide (PI) [产品号 #75002] 或 7 - AAD [7 - Aminoactinomycin D; 产品号 #75001]）。

另外，也可以通过对比分选后的细胞进行细胞离心涂片，然后使用Wright's或May - Grünwald染色（如Sigma - Aldrich 产品号 #W0625 或 #205435）来评估纯度。

实验数据

起始样本为正常健康供者的人全血，未裂红的分选所得细胞中嗜碱性粒细胞（CD123+ IgE+）的含量（以CD45 设门）通常可达 $97.3 \pm 1.1\%$ 。



在上述示例中，裂红的全血起始样本和未裂红的分选后的嗜碱性粒细胞含量分别为 0.73% 和 96.0%（以CD45设门），或 0.68% 和 89.8%（未以CD45设门）。