

# EasySep™ Direct 人 CTC 富集试剂盒

可处理 100 mL 全血

产品号 #19657

负选

文档号 #1000035801 | 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人全血中富集循环肿瘤细胞 (CTCs)。该试剂盒的优势有:

- > 99.9%的红细胞 (RBC) 去除率, 无需密度梯度离心、沉降或裂解
- 正常造血细胞去除率高达3个对数级
- 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CD2、CD14、CD16、CD19、CD45、CD61、CD66b和Glycophorin A表面标志物的抗体去除造血细胞和血小板。非目的细胞用抗体和EasySep™ Direct RapidSpheres™磁珠标记, 使用EasySep™磁极进行分选。轻松地将目的细胞收集到新试管中, 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CTC富集抗体混合物	19657C	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。
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, 并在收到后立即冷藏。  
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

为了最佳去除红细胞, 请使用肝素或酸式枸橼酸盐葡萄糖 (ACD) 作为抗凝剂来收集血液。不建议使用K2EDTA或K3EDTA作为抗凝剂。

为了获得最佳回收率, 请使用未经处理的人全血。对于存放时间超过24小时的样本, 目的细胞的回收率会降低。

可处理的血液样本量取决于富集过程中所用的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

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™ Direct 人 CTC 富集试剂盒操作流程

		EASYSEP™ 磁极	
步骤	说明	 EasySep™ (产品号 #18000)	 “The Big Easy” (产品号 #18001)
1	收集一定体积范围内的样本。	0.5 - 2 mL	1 - 7.5 mL
	将样本添加到所需的试管中。	5 mL (12 x 75 mm) 聚苯乙烯圆底流式管 (如: 产品号 #38007)	14 mL (17 x 95 mm) 聚苯乙烯圆底流式管 (如: 产品号 #38008)
2	在样本中加入富集抗体混合物。	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
3	涡旋振荡RapidSpheres™磁珠。 注意: 磁珠应呈均匀分散状态。	30 秒	30 秒
4	将RapidSpheres™磁珠加到样本中混匀	50 µL/mL 样本	50 µL/mL 样本
5	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"> <li>●若样本 ≤ 1.25 mL, 定容至两倍样本体积</li> <li>●若样本 &gt; 1.25 mL, 定容至2.5 mL</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>●若样本 ≤ 5 mL, 定容至两倍样本体积</li> <li>●若样本 &gt; 5 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10分钟	室温孵育10分钟
6	拿起磁极, 以一个连续的动作翻转磁极和试管*, 倾倒入清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
7	将RapidSpheres™磁珠添加到含有富集细胞的新试管中并混匀。	使用与步骤4相同的体积	使用与步骤4相同的体积
8	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
9	拿起磁极, 以一个连续的动作翻转磁极和试管*, 倾倒入清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。不要摇晃或擦拭掉仍可能挂在管口的任何液滴。

表2. EasySep™ Direct 人 CTC 富集试剂盒操作流程

步骤	说明	EASYSEP™磁极		
		 EasyEights™ (产品号 #18103) 	Easy 50 (产品号 #18002) 	
		5 mL流式管	14 mL流式管	
		0.5 - 2 mL	1 - 7.5 mL	5 - 25 mL
1	收集一定体积范围内的样本。 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)。	5 mL (12 x 75 mm) 聚苯乙烯圆底流式管 (如: 产品号 #38007)	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	在样本中加入富集抗体混合物。 混匀并孵育。	50 µL/mL 样本 室温孵育5分钟	50 µL/mL 样本 室温孵育5分钟	50 µL/mL 样本 室温孵育5分钟
3	涡旋振荡RapidSpheres™磁珠。 注意: 磁珠应呈均匀分散状态。	30 秒	30 秒	30 秒
4	将RapidSpheres™磁珠加到样本中混匀。	50 µL/mL 样本	50 µL/mL 样本	50 µL/mL 样本
5	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。 将试管(不加盖)放入磁极中并孵育。	●若样本 ≤ 1.25 mL, 定容至两倍样本体积 ●若样本 > 1.25 mL, 定容至2.5 mL 室温孵育10分钟	●若样本 ≤ 5 mL, 定容至两倍样本体积 ●若样本 > 5 mL, 定容至10 mL 室温孵育10分钟	定容至两倍体积 室温孵育10分钟
6	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5 mL流式管	使用新的14 mL流式管	使用新的50 mL锥形管
7	将RapidSpheres™磁珠添加到含有富集细胞的新试管中并混匀。	使用与步骤4相同的体积	使用与步骤4相同的体积	使用与步骤4相同的体积
8	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
9	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])。

## 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离心，在分选的细胞沉淀中仍然可见残留的红细胞，请使用小体积（0.2 - 2.5 mL）推荐缓冲液或其它所需的培养基重悬，并置于更小的EasySep™磁极中进行额外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

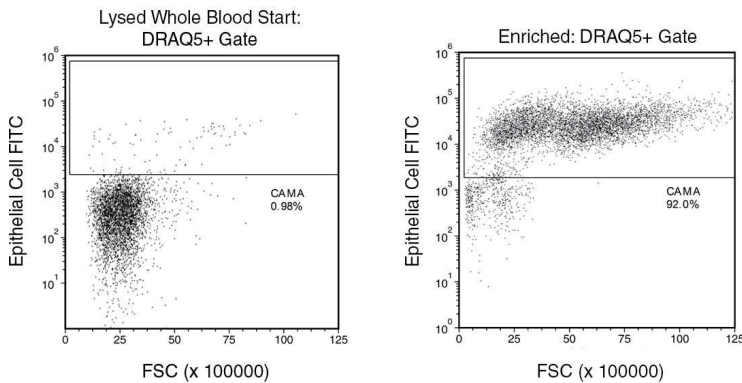
对于通过流式细胞术评估CTC细胞的纯度，请使用以下抗体克隆：

- 抗人上皮细胞抗体，克隆5E11.3.1，FITC（产品号 #60147FI）；
- DRAQ5™ 远红外荧光活细胞渗透DNA染料，eBioscience
- 注：评估DRAQ5™ 阳性细胞的纯度以排除碎片。

注：5E11表位与EpCAM具有相同的分布。

## 实验数据

起始样本为来自健康供者的人全血，加入约1%的CAMA细胞（上皮肿瘤细胞系），最终未裂红的富集组分中CTC（上皮细胞+）的含量为 $79 \pm 16\%$ （使用银色“Big Easy” EasySep™ 磁极；以DRAQ5™对有核细胞设门）。目标CD45+ 细胞的对数去除范围通常为2.8 - 3.2个对数级。



在上述实验中，CAMA细胞以0.98%的起始比例接种至全血中。富集后的CAMA细胞（上皮细胞+）含量为92.02%，CD45+ 细胞的去除率为3.8个对数级。