

## EasySep™小鼠间充质干/祖细胞富集试剂盒

可处理  $4 \times 10^8$  个细胞

产品号 #19771

负选

文档号 #10000035838 | 版本00



Scientists Helping Scientists™ | WWW.STEMCELL.COM

电话: 400 885 9050

E-MAIL: INFO.CN@STEMCELL.COM

### 产品介绍

通过免疫磁珠负选从小鼠密质骨细胞悬液中分离出无磁珠标记且高纯度的间充质干/祖细胞。当使用其他类型组织来源的单细胞悬液时，该试剂盒可能需要优化。

- 操作简单、快捷，且无需分离柱
- 纯度高达99%
- 分选得到的细胞不带标记

该试剂盒通过使用识别CD45和TER119细胞表面标志物的生物素化抗体来去除非间充质祖细胞。非目的细胞用生物素化抗体和磁珠标记，并通过EasySep™磁极进行无柱分选。目的细胞被简单地倾倒入至一个新的试管中。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™小鼠间充质祖细胞富集抗体混合物	19771C	1 x 0.4 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™生物素分选抗体混合物	18153	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™ D Magnetic Particles磁珠	19250	2 x 1 mL	2 - 8°C 储存，勿冷冻。	具体效期请见标签。	保存在TBS中的磁珠悬浮液。

BSA - 牛血清白蛋白；PBS - 磷酸盐缓冲液；TBS - Tris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

### 骨

- 1.用70%异丙醇清洁研钵和研杵。弃去异丙醇，并让研钵和研杵在无菌的生物安全柜中风干30分钟。在使用前用无菌PBS润洗研钵和研杵。
- 2.用酒精擦拭剪刀和镊子并风干。确保工具完全干燥，否则残留的酒精可能会降低细胞活力。
- 3.处死小鼠后：
  - a. 用70%异丙醇彻底润湿表皮，然后夹住并剥开，露出后肢。
  - b. 使用无菌锋利剪刀，在尽可能靠近脊柱的平行位置作一个小切口。夹住脚并将腿拉向头部，从小鼠身上取下完整的腿（髌骨、股骨和胫骨）。对小鼠另一条腿重复上述步骤。
  - c. 使用手术刀在脚踝上方切断胫骨以去除脚。将腿放置在髌骨朝上的位置，并夹住股骨靠近膝盖的位置，将手术刀沿着股骨向髌骨刮，使髌关节脱位。股骨头从髌关节脱位后，应该可以观察到股骨头。
  - d. 切除剩余的肌肉以去除髌骨。从膝关节中间切开并去除韧带和多余的组织。
- 4.使用手术刀刮擦骨头以彻底去除肌肉并切除骨髓。确保彻底清理骨头，没有任何残留肌肉组织附着。
- 5.制备90 mL的推荐缓冲液（用PBS混合2%胎牛血清（FBS）和1 mM EDTA。注：如处理多只小鼠的骨头，请相应地调整体积。
- 6.将清理干净骨头放入含有10 mL推荐缓冲液的研钵中。用研杵轻轻地压骨头，控制力度到刚好能将骨头敲开即可。轻轻搅拌，将骨髓（BM）从骨碎片中释放出来，并吸出缓冲液。

注：敲开骨头的压力需要轻柔。粗暴研磨骨头会导致细胞活率低，并且会产生过量的碎片。

注：包含骨髓的推荐缓冲液可以通过70 μm细胞滤筛（如产品号 #27215）过滤，并用于其他应用（例如细胞扩增或进行CFU-F检测）。
- 7.添加10 mL新鲜的推荐缓冲液并重复搅拌及去除骨髓。再重复清洗步骤4次（总共6次清洗）或直到大部分骨髓被去除（骨碎片变成白色）。
- 8.将骨碎片转移到100 mm培养皿中。添加2 mL I型胶原酶（0.25%；产品号 #07902）。确保骨头完全被溶液覆盖。静置3 - 5分钟。此步骤会软化骨头，使其更容易被切碎。
- 9.使用手术刀将剩余的骨碎片切成小块（1 - 2 mm碎片）。

注：需要足量的骨碎片才能释放足够的细胞以进行细胞分选。
- 10.将骨碎片和胶原酶溶液转移到50 mL聚丙烯管中，并添加更多I型胶原酶（0.25%），将最终体积定容到至少10 mL或2 mL/只小鼠。
- 11.用Parafilm®密封盖子，并将管子放入37°C水浴摇床中以最大速度摇晃45分钟。如果使用细菌培养摇床，请将速度设置为 ~200 rpm。
- 12.45分钟后，从摇床上取下管子，并添加推荐缓冲液定容至30 mL。收集上清液并通过70 μm细胞滤筛过滤。在原来的管子中再添加10 mL推荐缓冲液来清洗骨碎片，混合后让碎片沉降3 - 4分钟。使用70 μm细胞滤筛过滤上清，并与之前收集的细胞合并（最终体积为 40 mL）。
- 13.在室温（15 - 25°C）下以 300 x g 离心 10 分钟，并小心除去上清液。
- 14.使用推荐缓冲液以2 - 5 x 10<sup>7</sup> 细胞/mL的浓度重悬细胞沉淀（细胞悬液中可能存在小颗粒和碎片），并放置在冰上备用。

注：预计每只小鼠可回收1.5 - 3.5 x 10<sup>6</sup> 个细胞（2根股骨和 2根胫骨）。如果每只小鼠得到超过 5 x 10<sup>6</sup> 个细胞，则表明骨髓未充分去除。

## 推荐缓冲液

EasySep™缓冲液（产品号 #20144）或含2% FBS和1 mM EDTA的PBS。HBSS，调整配方（不含Ca<sup>++</sup>和Mg<sup>++</sup>；产品号 #37250）可用于代替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EasySep™的详细使用说明，请参阅表1。

表1. EasySep™ 小鼠间充质干/祖细胞富集试剂盒操作流程

		EASYSEP™ 磁极
步骤	说明	 EasySep™ (产品号 #18000)
1	按指定细胞浓度制备样本，样本体积在范围内。	2 - 5 x 10 <sup>7</sup> 细胞/mL 0.2 - 0.5 mL 注：若起始样本少于4 x 10 <sup>6</sup> 个细胞，请使用0.2 mL缓冲液重悬细胞。
	将样本添加到所需的试管中。	5 mL (12 x 75 mm) 圆底聚苯乙烯流式管 (如：产品号 #38007)
2	在样本中加入富集抗体混合物。	50 µL/mL 样本
	混匀并孵育。	在2 - 8°C下孵育15分钟
3	将推荐的缓冲液添加到样本中。	定容至4.5 mL
	离心。	以400 x g离心5分钟
4	去除上清液，并使用推荐的缓冲液重悬细胞。	使用与步骤1相同的体积
5	在样本中加入分选抗体混合物。	250 µL/mL 样本
	混匀并孵育。	在2 - 8°C下孵育15分钟
6	涡旋磁珠。 注意：磁珠应呈均匀分散状态。	30秒
7	将磁珠加入到样本中。	150 µL/mL 样本
	混匀并孵育。	在2 - 8°C下孵育15分钟
8	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
	将试管（不加盖）放入磁极中并孵育。	室温孵育5分钟
9	拿起磁极，以一个连续的动作翻转磁极和试管*，倾倒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)

\* 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。

## 注意事项和提示

### 扩增实验方法

按照第2页“样本制备”中所述的方法收集和处理小鼠密质骨细胞。按照表2所述，在MesenCult™完全培养基（小鼠）中制备未富集和富集的小鼠密质骨细胞。

表2. 使用MesenCult™ 扩增试剂盒（小鼠；产品号 #05513）的扩增实验方法

样本	未富集的密质骨细胞		富集的密质骨细胞	
培养条件	缺氧环境*		缺氧环境*	
使用的培养基及体积	2 mL MesenCult™完全培养基（小鼠）	10 mL MesenCult™完全培养基（小鼠）	2 mL MesenCult™完全培养基（小鼠）	10 mL MesenCult™完全培养基（小鼠）
铺板的细胞数	6孔板， 2 - 5 x 10 <sup>5</sup> 个细胞/孔	T-25 cm <sup>2</sup> 组织培养瓶， 0.6 - 1.2 x 10 <sup>6</sup> 个细胞/瓶	6孔板， 1 - 5 x 10 <sup>4</sup> 个细胞/孔	T-25 cm <sup>2</sup> 组织培养瓶， 0.4 - 1.2 x 10 <sup>5</sup> 个细胞/瓶

\* 缺氧环境指5% O<sub>2</sub>、10% CO<sub>2</sub>。

1. 使用缺氧小室（产品号 #27310）在缺氧环境中以37°C培养细胞8 - 14天，直至形成贴壁细胞层。8天后，如果培养基颜色变为橙色，可以进行一次半换液。
2. 7天后在显微镜下观察间充质细胞以确定细胞汇合度。细胞达到80%汇合度后可以进行传代；达到80%汇合度一般需要7 - 16天。
3. 参照MesenCult™ 扩增试剂盒（小鼠；文档号 #05513）产品说明书中提供的方法进行传代。

### 纯度评估

若要使用流式细胞术评估非间充质祖细胞的去除率，可以使用以下荧光抗体克隆：

- 抗小鼠CD45抗体，克隆30-F11（产品号 #60030），以及
- 抗小鼠TER119抗体，克隆TER-119（产品号 #60033）。

也可使用以下方法评估纯度：

进行小鼠集落形成单位 - 成纤维细胞（CFU-F）分析时，密质骨细胞样本应使用3种不同的铺板密度，以确保有足够的集落数量来准确评估小鼠骨细胞中的祖细胞含量。

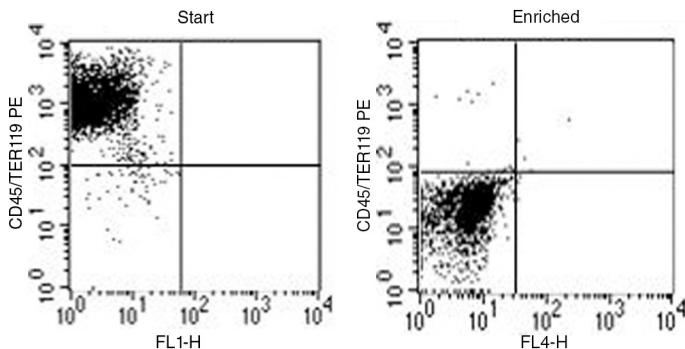
表3. 采用CFU-F测定评估纯度

样本	未富集的密质骨细胞	富集的密质骨细胞
培养条件	缺氧环境*	
使用的培养基及体积	2 mL MesenCult™完全培养基（小鼠）	
铺板的细胞数	在6孔板中以1000、5000和10,000个细胞/cm <sup>2</sup> 进行铺板，每个铺板密度设置一个复孔。 （例如：以10,000、50,000和100,000个细胞/孔进行铺板）	在6孔板中以50 - 250个细胞/cm <sup>2</sup> 进行铺板，并设置一个复孔。 （例如：以500 - 2,500个细胞/孔进行铺板）

\* 缺氧环境指5% O<sub>2</sub>、10% CO<sub>2</sub>。

在37°C下，培养细胞10 - 13天。无需更换培养基。

## 实验数据



起始样本为小鼠密质骨细胞，富集后的CD45-TER119-细胞含量通常可达50% - 99%。在上述实验中，起始样本和富集后的目的细胞纯度分别为1.4%和99.1%。CFU-F富集倍数通常为50 - 200倍。

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、EasySep和MesenCult均是STEMCELL Technologies Canada Inc.的商标。Parafilm是Bemis Company, 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，对此类信息的准确性或完整性不作任何保证或声明。