



Negative Selection
Catalog #89684

EasySep™ Direct HLA Crossmatch B Cell Isolation Kit

For processing 100 mL whole blood



Scientists Helping Scientists™ | WWW.STEMCELL.COM

TOLL FREE PHONE 1 800 667 0322 • PHONE +1 604 877 0713
INFO@STEMCELL.COM • TECHSUPPORT@STEMCELL.COM
FOR GLOBAL CONTACT DETAILS VISIT OUR WEBSITE

Document #DX21446 | Version 1_0_0

ENGLISH

Intended Use

For the isolation of B cells from human whole blood, spleen, and lymph node samples.

Product Description

This kit targets non-B cells for removal by immunomagnetic negative selection with antibodies recognizing specific cell surface markers. Unwanted cells are labeled with antibodies and EasySep™ Direct RapidSpheres™, and separated using an EasySep™ magnet. Desired cells are simply collected into a new tube and are immediately available for downstream in vitro diagnostic applications.

Quality Control

EasySep™ Direct products are manufactured using aseptic technique and tightly controlled processes.

Each lot of EasySep™ Direct cocktail and particles is sterility tested according to USP methods and performance tested in cell isolation assays.

Storage and Stability

Store at 2 - 8°C. This product may be shipped at 15 - 25°C, but should be refrigerated upon receipt. Do not freeze. Product stable at 2 - 8°C until expiry date (EXP) on label.

Warnings and Precautions

1. For in vitro diagnostic use by laboratory professionals.
2. Do not use if vial contents have leaked. Unused product may be disposed of according to standard laboratory procedures for non-hazardous liquids.
3. This product should be handled by trained personnel observing good laboratory practices. Once this product is added to human cells, treat the suspension as potentially biohazardous. Handling of reagents and disposal of wastes should observe all local, state, or national regulations.
4. This product is a potential irritant to eyes, respiratory system, and skin. This product may also be harmful if ingested. Avoid exposure through skin, eye contact, inhalation, and ingestion.
5. RoboSep™ is provided as a piece of general laboratory equipment. User is responsible for validating RoboSep™ to meet their specific requirements.
6. User is responsible for validating the performance of the isolated cells in downstream assays.

Component Descriptions

COMPONENT NAME	COMPONENT #	QUANTITY	FORMAT
EasySep™ Direct HLA Crossmatch B Cell Isolation Cocktail	89684C	2 x 2.5 mL	A combination of monoclonal antibodies in PBS.
EasySep™ Direct RapidSpheres™ 50302	50302	4 x 2.5 mL	A suspension of magnetic particles and monoclonal antibodies in PBS.

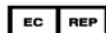
PBS - phosphate-buffered saline

Precipitate may be observed in the cocktail vial but will not affect performance.



STEMCELL Technologies Inc | 1618 Station Street, Vancouver, BC | V6A 1B6 | Canada | www.stemcell.com

For Technical Assistance
Tel: +1.604.877.0713
European toll-free number: 00800 7836 2355
e-mail: techsupport@stemcell.com



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover • Germany



Document #DX21446
Version 1.0.0
2017

Sample Preparation

For optimal RBC depletion, collect blood using heparin or acid citrate dextrose (ACD) as an anticoagulant.

For best recovery, use unprocessed human whole blood. Recovery of the desired enriched cells decreases with samples that are older than 24 hours.

The volume of sample that can be processed depends on the EasySep™ magnet used for the enrichment procedure. Samples must be placed in the required tube to properly fit into the appropriate EasySep™ magnet (see Tables 1 - 4).

BUFFY COAT

1. Add an equal volume of recommended medium to whole blood.
2. Centrifuge at 800 x g for 10 minutes at room temperature (15 - 25°C) with the brake off.
3. Remove the concentrated leukocyte band (this is the buffy coat), plus a small portion of the plasma and concentrated red blood cells (RBCs). The target is to concentrate the leukocytes approximately 5-fold while maintaining the same hematocrit.
4. Transfer a maximum of 7 mL of buffy coat to the required tube (see Tables 1, 2, and 6).

SPLEEN or LYMPH NODE

Disrupt spleen or lymph node in PBS or Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) containing 2% fetal bovine serum (FBS). Remove aggregates and debris by passing the cell suspension through a pre-wetted 100 µm mesh nylon strainer. Rinse the strainer with PBS or HBSS containing 2% FBS. Centrifuge at 300 x g for 10 minutes and resuspend at 1 - 100 x 10⁶ cells/mL in recommended medium.

Recommended Medium

D-PBS (Without Ca++ and Mg++; Catalog #37350)

Materials Required But Not Provided

EasySep™ Magnet (Catalog #18000), "The Big Easy" EasySep™ Magnet (Catalog #18001), Easy 50 EasySep™ Magnet (Catalog #18002), EasyEights™ EasySep™ Magnet (Catalog #18103), or RoboSep™-S (Catalog #21000).



Directions for Use – Manual EasySep™ Protocols

See page 1 for Sample Preparation and Recommended Medium. Refer to Tables 1 - 4 for detailed instructions regarding the EasySep™ procedure for each magnet.

Table 1. EasySep™ Direct HLA Crossmatch B Cell Isolation Kit Protocol for WHOLE BLOOD or BUFFY COAT

		EASYSEP™ MAGNETS	
STEP	INSTRUCTIONS	 EasySep™ (Catalog #18000)	 “The Big Easy” (Catalog #18001)
1	Collect sample within the volume range.	0.5 - 1.5 mL	1 - 7 mL
	Add sample to required tube.	5 mL (12 x 75 mm) polystyrene round-bottom tube (e.g. Catalog #38007)	14 mL (17 x 95 mm) polystyrene round-bottom tube (e.g. Catalog #38008)
2	Vortex RapidSpheres™. NOTE: Particles should appear evenly dispersed.	30 seconds	30 seconds
3	Add Isolation Cocktail to sample.	50 µL/mL of sample	50 µL/mL of sample
4	Add RapidSpheres™ to sample.	50 µL/mL of sample	50 µL/mL of sample
	Mix and incubate.	RT for 5 minutes	RT for 5 minutes
5	Add recommended medium to top up the sample to the indicated volume. Mix by gently pipetting up and down 2 - 3 times.	Top up to 2.5 mL	- Top up to double the volume for samples ≤ 5 mL - Top up to 10 mL for samples > 5 mL
	Place the tube (without lid) into the magnet and incubate.	RT for 5 minutes	RT for 5 minutes
6	Pick up the magnet, and in one continuous motion invert the magnet and tube, pouring the enriched cell suspension* into a new tube.	Use a new 5 mL tube	Use a new 14 mL tube
7	Add RapidSpheres™ to the new tube containing the enriched cells.	Use same volume as in step 4	Use same volume as in step 4
	Mix and incubate.	RT for 5 minutes	RT for 5 minutes
8	Remove the tube from the magnet and place the tube from step 7 (without lid) into the magnet and incubate for a second separation.	RT for 5 minutes	RT for 5 minutes
9	Pick up the magnet, and in one continuous motion invert the magnet and tube,** pouring the enriched cell suspension into a new tube.	Isolated cells are ready for use	Use a new 14 mL tube
10	Remove the tube from the magnet and place the new tube from step 9 (without lid) into the magnet and incubate for a third separation.	---	RT for 5 minutes
11	Pick up the magnet, and in one continuous motion invert the magnet and tube,** pouring the enriched cell suspension into a new tube.	---	Isolated cells are ready for use

RT - room temperature (15 - 25°C)

* Following the first magnetic separation the collected cells may contain a significant amount of RBCs and may look similar to the original unprocessed human whole blood sample.

** To minimize RBC contamination in the isolated cells, pour off the sample along a clean area of the tube (i.e. the opposite side to where the sample was poured in).



Table 2. EasySep™ Direct HLA Crossmatch B Cell Isolation Kit Protocol for WHOLE BLOOD or BUFFY COAT

		EASYSEP™ MAGNETS		
STEP	INSTRUCTIONS	EasyEights™ (Catalog #18103)		Easy 50 (Catalog #18002)
		5 mL tube	14 mL tube	
1	Collect sample within the volume range.	0.5 - 1.5 mL	1 - 7 mL	7 - 30 mL
	Add sample to required tube.	5 mL (12 x 75 mm) polystyrene round-bottom tube (e.g. Catalog #38007)	14 mL (17 x 95 mm) polystyrene round-bottom tube (e.g. Catalog #38008)	50 mL conical tube (e.g. Catalog #38010)
2	Vortex RapidSpheres™. NOTE: Particles should appear evenly dispersed.	30 seconds	30 seconds	30 seconds
3	Add Isolation Cocktail to sample.	50 µL/mL of sample	50 µL/mL of sample	50 µL/mL of sample
4	Add RapidSpheres™ to sample.	50 µL/mL of sample	50 µL/mL of sample	50 µL/mL of sample
	Mix and incubate.	RT for 5 minutes	RT for 5 minutes	RT for 5 minutes
5	Add recommended medium to top up the sample to the indicated volume. Mix by gently pipetting up and down 2 - 3 times.	Top up to 2.5 mL	- Top up to double the volume for samples ≤ 5 mL - Top up to 10 mL for samples > 5 mL	- Top up to double the volume for samples ≤ 25 mL - Top up to 50 mL for samples > 25 mL
	Place the tube (without lid) into the magnet and incubate.	RT for 5 minutes	RT for 5 minutes	RT for 10 minutes
6	Carefully pipette*** (do not pour) the enriched cell suspension into a new tube. NOTE: Collect the entire clear fraction from top to bottom. For optimal recovery, also collect a small volume of RBCs (up to 10% of the starting sample volume).	Use a new 5 mL tube	Use a new 14 mL tube	Use a new 50 mL tube
7	Add RapidSpheres™ to the new tube containing the enriched cells.	Use same volume as in step 4	Use same volume as in step 4	Use same volume as in step 4
	Mix and incubate.	RT for 5 minutes	RT for 5 minutes	RT for 5 minutes
8	Remove the tube from the magnet and place the tube from step 7 (without lid) into the magnet and incubate for a second separation.	RT for 5 minutes	RT for 5 minutes	RT for 5 minutes
9	Carefully pipette*** (do not pour) the enriched cell suspension into a new tube. NOTE: Collect only the clear fraction.	Use a new 5 mL tube	Use a new 14 mL tube	Use a new 50 mL tube
10	Remove the tube from the magnet and place the new tube from step 9 (without lid) containing the enriched cells into the magnet and incubate for a third separation.	RT for 5 minutes	RT for 5 minutes	RT for 5 minutes
11	Carefully pipette*** (do not pour) the enriched cell suspension into a new tube. NOTE: Collect only the clear fraction.	Isolated cells are ready for use	Isolated cells are ready for use	Isolated cells are ready for use

RT - room temperature (15 - 25°C)

*** Collect the entire supernatant, all at once, into a single pipette (e.g. for EasyEights™ 5 mL tube use a 2 mL serological pipette [Catalog #38002]; for EasyEights™ 14 mL tube use a 10 mL serological pipette [Catalog #38004]).



Table 3. EasySep™ Direct HLA Crossmatch B Cell Isolation Kit Protocol for SPLEEN or LYMPH NODE

		EASYSEP™ MAGNETS	
STEP	INSTRUCTIONS	 EasySep™ (Catalog #18000)	"The Big Easy" (Catalog #18001) 
1	Collect sample within the volume range.	0.5 - 1.5 mL	1 - 7 mL
	Add sample to required tube.	5 mL (12 x 75 mm) polystyrene round-bottom tube (e.g. Catalog #38007)	14 mL (17 x 95 mm) polystyrene round-bottom tube (e.g. Catalog #38008)
2	Add Isolation Cocktail to sample.	50 µL/mL of sample	50 µL/mL of sample
	Mix and incubate.	RT for 5 minutes	RT for 5 minutes
3	Vortex RapidSpheres™. NOTE: Particles should appear evenly dispersed.	30 seconds	30 seconds
4	Add RapidSpheres™ to sample. Mix by gently pipetting up and down 2 - 3 times.	50 µL/mL of sample	50 µL/mL of sample
5	Add recommended medium to top up the sample to the indicated volume.	Top up to 2.5 mL	• Top up to double the volume for samples ≤ 5 mL • Top up to 10 mL for samples > 5 mL
	Place the tube (without lid) into the magnet and incubate.	RT for 3 minutes	RT for 3 minutes
6	Pick up the magnet, and in one continuous motion invert the magnet and tube, pouring the enriched cell suspension into a new tube.	Use a new 5 mL tube	Use a new 14 mL tube
7	Add RapidSpheres™ to the new tube containing the enriched cells. Mix by gently pipetting up and down 2 - 3 times.	Use same volume as in step 4	Use same volume as in step 4
8	Remove the tube from the magnet and place the tube from step 7 (without lid) into the magnet and incubate for a second separation.	RT for 3 minutes	RT for 3 minutes
9	Pick up the magnet, and in one continuous motion invert the magnet and tube, pouring the enriched cell suspension into a new tube.	Isolated cells are ready for use	Isolated cells are ready for use

RT - room temperature (15 - 25°C)



Table 4. EasySep™ Direct HLA Crossmatch B Cell Isolation Kit Protocol for SPLEEN or LYMPH NODE

STEP	INSTRUCTIONS	EASYSEP™ MAGNETS	
		EasyEights™ (Catalog #18103)	
		5 mL tube	14 mL tube
1	Collect sample within the volume range.	0.5 - 1.5 mL	1 - 7 mL
	Add sample to required tube.	5 mL (12 x 75 mm) polystyrene round-bottom tube (e.g. Catalog #38007)	14 mL (17 x 95 mm) polystyrene round-bottom tube (e.g. Catalog #38008)
2	Add Isolation Cocktail to sample.	50 µL/mL of sample	50 µL/mL of sample
	Mix and incubate.	RT for 5 minutes	RT for 5 minutes
3	Vortex RapidSpheres™. NOTE: Particles should appear evenly dispersed.	30 seconds	30 seconds
4	Add RapidSpheres™ to sample. Mix by gently pipetting up and down 2 - 3 times.	50 µL/mL of sample	50 µL/mL of sample
5	Add recommended medium to top up sample to the indicated volume. Mix by gently pipetting up and down 2 - 3 times.	Top up to 2.5 mL	- Top up to double the volume for samples ≤ 5 mL - Top up to 10 mL for samples > 5 mL
	Place the tube (without lid) into the magnet and incubate.	RT for 3 minutes	RT for 3 minutes
6	Carefully pipette*** (do not pour) the enriched cell suspension into a new tube. NOTE: Collect the entire clear fraction from top to bottom. For optimal recovery, also collect a small volume of RBCs, if present (up to 10% of the starting sample volume).	Use a new 5 mL tube	Use a new 14 mL tube
7	Add RapidSpheres™ to the new tube containing the enriched cells. Mix by gently pipetting up and down 2 - 3 times.	Use same volume as in step 4	Use same volume as in step 4
8	Remove the tube from the magnet and place the tube from step 7 (without lid) into the magnet and incubate for a second separation.	RT for 3 minutes	RT for 3 minutes
9	Carefully pipette*** (do not pour) the enriched cell suspension into a new tube. NOTE: Collect only the clear fraction.	Use a new 5 mL tube For lymph node: Isolated cells are ready for use	Use a new 14 mL tube For lymph node: Isolated cells are ready for use
10	Remove the tube from the magnet and place the new tube from step 9 (without lid) containing the enriched cells into the magnet and incubate for a third separation.	For spleen: RT for 3 minutes	For spleen: RT for 3 minutes
11	Carefully pipette*** (do not pour) the enriched cell suspension into a new tube. NOTE: Collect only the clear fraction.	For spleen: Isolated cells are ready for use	For spleen: Isolated cells are ready for use

RT - room temperature (15 - 25°C)

*** Collect the entire supernatant, all at once, into a single pipette (e.g. for EasyEights™ 5 mL tube use a 2 mL serological pipette [Catalog #38002]; for EasyEights™ 14 mL tube use a 10 mL serological pipette [Catalog #38004]).



Directions for Use – Fully Automated RoboSep™ Protocol

See page 1 for Sample Preparation and Recommended Medium. Refer to Tables 5 and 6 for detailed instructions regarding the RoboSep™ procedure.

Table 5. RoboSep™ Direct HLA Crossmatch B Cell Isolation Kit Protocol for WHOLE BLOOD, SPLEEN, or LYMPH NODE

STEP	INSTRUCTIONS	RoboSep™ (Catalog #20000 and #21000)	
1	Prepare sample at the indicated cell concentration within the volume range.	For spleen or lymph node: 0.5 - 6 mL at $1 - 100 \times 10^6$ cells/mL For blood: 0.5 - 6 mL	
	Add sample to required tube.	14 mL (17 x 95 mm) polystyrene round-bottom tube (e.g. Catalog #38008)	
2	Select protocol.	EasySep™ Direct HLA Crossmatch B Cell Isolation Kit – For WB, Spleen, LN	
3	Vortex RapidSpheres™. NOTE: Particles should appear evenly dispersed.	30 seconds	
4	Load the carousel.	Follow on-screen prompts	
	Start the protocol.	Press the green “Run” button	
5	Unload the carousel when the run is complete.	Isolated cells are ready for use	

Table 6. RoboSep™ Direct HLA Crossmatch B Cell Isolation Kit Protocol for BUFFY COAT

STEP	INSTRUCTIONS	RoboSep™ (Catalog #20000 and #21000)	
1	Prepare sample within the volume range.	2 - 6 mL	
	Add sample to required tube.	14 mL (17 x 95 mm) polystyrene round-bottom tube (e.g. Catalog #38008)	
2	Select protocol.	EasySep™ Direct HLA Crossmatch B Cell Isolation Kit – For BC	
3	Vortex RapidSpheres™. NOTE: Particles should appear evenly dispersed.	30 seconds	
4	Load the carousel.	Follow on-screen prompts	
	Start the protocol.	Press the green “Run” button	
5	Unload the carousel when the run is complete.	Isolated cells are ready for use	

Notes and Tips

REMOVAL OF RESIDUAL RBCs IN THE ISOLATED CELLS

Typically, further RBC depletion is not required following cell isolation. If residual RBCs are visible in the isolated cell pellet following centrifugation after the end of the protocol, resuspend in a small volume (0.2 - 2.5 mL) of recommended medium or desired culture medium and place in a smaller EasySep™ magnet for an additional 5-minute separation. Collect the supernatant and the isolated cells are now ready for use in downstream applications. Residual RBCs may also be lysed using Ammonium Chloride Solution (Catalog #07800).

ASSESSING PURITY

For purity assessment of B cells by flow cytometry use the following fluorochrome-conjugated antibody clones:

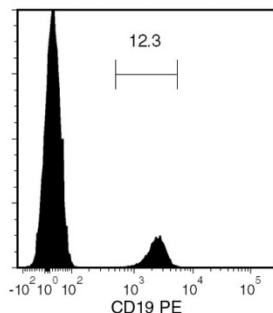
- Anti-Human CD19 Antibody, Clone HIB19 (Catalog #60005), and
- Anti-Human CD45 Antibody, Clone HI30 (Catalog #60018)

NOTE: It is recommended to assess purity on the CD45-positive cells to exclude debris, platelets, and RBCs.

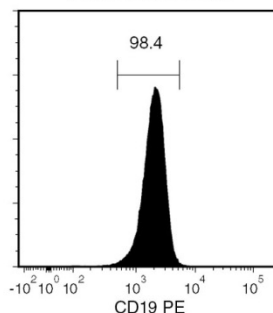
Data

Starting with human whole blood from normal healthy donors, the B cell (CD19+) content of the non-lysed final isolated fraction typically ranges from 89 - 99.8% (gated on CD45).

Lysed Whole Blood Start: CD45+ Gate



Isolated: CD45+ Gate



In the above example, the B cell (CD19+) content of the lysed whole blood start sample and non-lysed final isolated fraction is 12.3% and 98.4% (gated on CD45), respectively.

Technical Assistance

For technical support, contact us at techsupport@stemcell.com or call either +1.604.877.0713 or the European toll-free number 00800 7836 2355. For more information, visit www.stemcell.com.

If you require a printed copy or a translated version of this document in a certain language, contact technical support.

Catalog or reference number	Batch code	Use by: MM/YYYY
Caution, consult accompanying documents	In Vitro Diagnostic Medical Device	For storage within temperature limits
Consult Instructions for Use	Do not re-use	Contains sufficient for n tests
CE Mark	Manufacturer's identification (name & address)	Authorized EC representative in the European Community

STEMCELL TECHNOLOGIES INC.'S QUALITY MANAGEMENT SYSTEM IS CERTIFIED TO ISO 13485. PRODUCTS ARE FOR PROFESSIONAL IN VITRO DIAGNOSTIC USE.

Copyright © 2017 by STEMCELL Technologies Inc. All rights reserved including graphics and images. STEMCELL Technologies & Design, STEMCELL Shield Design, Scientists Helping Scientists, EasyEights, EasySep, RapidSpheres, and RoboSep are trademarks of STEMCELL Technologies Canada Inc. All other trademarks are the property of their respective holders. While STEMCELL has made all reasonable efforts to ensure that the information provided by STEMCELL and its suppliers is correct, it makes no warranties or representations as to the accuracy or completeness of such information.



**EasySep™ Direct HLA
Crossmatch B Cell
Isolation Kit**

Sélection négative

N° de catalogue 89684 Traitement de 100 mL de sang total



Scientists Helping Scientists™ | [WWW.STEMCELL.COM](http://www.stemcell.com)

TOLL FREE PHONE 1 800 667 0322 • PHONE +1 604 877 0713

INFO@STEMCELL.COM • TECHSUPPORT@STEMCELL.COM

FOR GLOBAL CONTACT DETAILS VISIT OUR WEBSITE

N° de document DX21446 | Version 1_0_0

FRANÇAIS

Usage Prévu

Isolement des cellules B dans les échantillons humains de sang total, de rate et de ganglion lymphatique.

Description du Produit

Ce kit cible les cellules non-B en vue de leur élimination par sélection négative immuno-magnétique grâce à des anticorps qui reconnaissent certains marqueurs de surface cellulaire bien précis. Les cellules indésirables sont marquées par des anticorps et par EasySep™ Direct RapidSpheres™, et sont séparées au moyen d'un aimant EasySep™. Les cellules désirées sont simplement recueillies dans un nouveau tube à essai et sont immédiatement utilisables dans des applications de diagnostic *in vitro* en aval.

Contrôle de la Qualité

Les produits EasySep™ Direct sont fabriqués selon une technique aseptique et des processus étroitement contrôlés.

La stérilité de chaque lot de cocktail et de particules EasySep™ Direct est contrôlée conformément aux méthodes de l'USP et sa performance grâce à des tests par isolement de cellules.

Entreposage et Stabilité

Entreposer entre 2 et 8 °C. Ce produit peut être expédié à une température de 15 à 25 °C, mais doit être réfrigéré dès sa réception. Ne pas congeler. Le produit est stable entre 2 et 8 °C jusqu'à la date de péremption (EXP) figurant sur l'étiquette.

Mises en Garde et Précautions

1. Destiné à un usage diagnostique *in vitro* par des professionnels de laboratoire.
2. Ne pas utiliser en cas de fuite du contenu du flacon. Le produit inutilisé peut être éliminé conformément aux procédures de laboratoire habituelles concernant les liquides non dangereux.
3. Seul le personnel formé qui observe de bonnes pratiques de laboratoire devrait manipuler ce produit. Une fois ce produit ajouté à des cellules humaines, traiter la suspension comme une matière biologique potentiellement dangereuse. La manipulation des réactifs et l'élimination des déchets doivent respecter tous les règlements municipaux, régionaux ou nationaux.
4. Ce produit peut irriter les yeux, l'appareil respiratoire et la peau. Ce produit peut également être nocif en cas d'ingestion. Éviter toute exposition par la peau, le contact avec les yeux, l'inhalation et l'ingestion.
5. RoboSep™ est fourni à titre d'appareil d'équipement de laboratoire général. Il incombe à l'utilisateur de valider RoboSep™ en fonction de ses besoins particuliers.
6. L'utilisateur est responsable de la validation de la performance des cellules isolées dans les tests en aval.

Descriptions des Composantes

NOM DE LA COMPOSANTE	N° DE LA COMPOSANTE	QUANTITÉ	FORMAT
EasySep™ Direct HLA Crossmatch B Cell Isolation Cocktail	89684C	2 x 2,5 mL	Combinaison d'anticorps monoclonaux en PBS.
EasySep™ Direct RapidSpheres™ 50302	50302	4 x 2,5 mL	Suspension de particules magnétiques et d'anticorps monoclonaux en PBS.

PBS - solution saline tamponnée au phosphate

Des précipités peuvent être observés dans le flacon du cocktail, mais n'affecteront pas la performance.



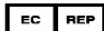
STEMCELL Technologies Inc | 1618 Station Street, Vancouver, BC | V6A 1B6 | Canada | www.stemcell.com

For Technical Assistance

Tel: +1 604 877 0713

European toll-free number: 00800 7836 2355

email: techsupport@stemcell.com



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hanovre • Germany



Document #DX21446

Version 1.0.0

2017

Préparation de L'échantillon

Pour une déplétion optimale des globules rouges, prélever les échantillons de sang en utilisant de l'héparine ou une solution de dextrose et d'acide citrique (ACD) comme anticoagulant.

Pour obtenir une récupération optimale, utiliser du sang total humain non traité. La récupération des cellules enrichies souhaitées est plus faible dans les échantillons qui remontent à plus de 24 heures.

Le volume de l'échantillon traitable dépend de l'aimant EasySep™ utilisé pendant la procédure d'enrichissement. Il faut placer les échantillons dans le tube à essai prescrit pour qu'ils s'adaptent correctement à l'aimant EasySep™ approprié (voir les tableaux 1 à 4).

COUCHE LEUCOCYTO-PLAQUETTAIRE (BUFFY COAT)

1. Ajouter un volume égal du milieu recommandé au sang total.
2. Centrifuger à 800 x g pendant 10 minutes à température ambiante (entre 15 et 25 °C), sans frein.
3. Retirer la couche leucocyto-plaquettaire concentrée ainsi qu'une petite portion du plasma et des globules rouges concentrés. L'objectif consiste à concentrer les leucocytes environ cinq fois tout en maintenant le même hématocrite.
4. Transférer au plus 7 mL de la couche leucocyto-plaquettaire vers le tube à essai prescrit (voir les tableaux 1, 2 et 6).

RATE ou GANGLION LYMPHATIQUE

Dissocier la rate ou le ganglion lymphatique dans une PBS ou une solution saline équilibrée de Hank (Hanks' Balanced Salt Solution – HBSS) contenant 2 % de sérum de veau fœtal (SVF). Supprimer les agrégats et les débris en faisant passer la suspension cellulaire par un tamis en nylon préhumidifié à maille de 100 µm. Rincer le tamis avec une PBS ou une HBSS contenant 2 % de SVF. Centrifuger à 300 x g pendant 10 minutes, puis remettre en suspension entre 1 et 100 x 10⁶ cellules/mL dans le milieu recommandé.

Milieu Recommandé

D-PBS (sans Ca++ et Mg++; n° de catalogue 37350)

Matériel Requis, non Fourni

Aimant EasySep™ (n° de catalogue 18000), aimant "The Big Easy" EasySep™ (n° de catalogue 18001), aimant Easy 50 EasySep™ (n° de catalogue 18002), aimant EasySep™ EasyEights™ (n° de catalogue 18103) ou RoboSep™-S (n° de catalogue 21000).



Mode d'Emploi – Protocoles Manuels EasySep™

Voir la page 1 pour consulter la préparation de l'échantillon et le milieu recommandé. Se reporter aux tableaux 1 à 4 pour obtenir des instructions détaillées concernant la procédure EasySep™ pour chaque aimant.

Tableau 1. Protocole du Kit d'Isolément de Cellules B par épreuve de Compatibilité Croisée de l'Antigène HLA EasySep™ pour SANG TOTAL ou COUCHE LEUCOCYTO-PLAQUETTAIRE

		AIMANTS EASYSEP™	
ÉTAPE	INSTRUCTIONS	 EasySep™ (n° de catalogue 18000)	 "The Big Easy" (n° de catalogue 18001)
1	Prélever l'échantillon dans la fourchette de volume prescrite.	De 0,5 à 1,5 mL	De 1 à 7 mL
	Ajouter l'échantillon au tube à essai prescrit.	Tube à essai à fond rond en polystyrène de 5 mL (12 x 75 mm) (p. ex., n° de catalogue 38007)	Tube à essai à fond rond en polystyrène de 14 mL (17 x 95 mm) (p. ex., n° de catalogue 38008)
2	Vortex RapidSpheres™. REMARQUE : Les particules doivent paraître uniformément dispersées.	30 secondes	30 secondes
3	Ajouter le cocktail d'isolement à l'échantillon.	50 µL/mL d'échantillon	50 µL/mL d'échantillon
4	Ajouter RapidSpheres™ à l'échantillon.	50 µL/mL d'échantillon	50 µL/mL d'échantillon
	Mélanger et incuber.	TA pendant 5 minutes	TA pendant 5 minutes
5	Ajouter le milieu recommandé jusqu'à obtention du volume d'échantillon indiqué. Mélanger doucement par pipetage deux ou trois fois.	Remplir jusqu'à 2,5 mL	- Remplir jusqu'au double de volume pour les échantillons ≤ 5 mL - Remplir jusqu'à 10 mL pour les échantillons > 5 mL
	Placer le tube à essai (sans le couvercle) dans l'aimant et incuber.	TA pendant 5 minutes	TA pendant 5 minutes
6	Ramasser l'aimant et, dans un seul mouvement continu, inverser l'aimant et le tube à essai et verser la suspension cellulaire enrichie* dans un nouveau tube à essai.	Utiliser un nouveau tube à essai de 5 mL	Utiliser un nouveau tube à essai de 14 mL
7	Ajouter RapidSpheres™ au nouveau tube à essai contenant les cellules enrichies.	Utiliser le même volume qu'à l'étape 4	Utiliser le même volume qu'à l'étape 4
	Mélanger et incuber.	TA pendant 5 minutes	TA pendant 5 minutes
8	Retirer le tube à essai de l'aimant et placer le tube à essai de l'étape 7 (sans le couvercle) dans l'aimant, puis incuber en vue d'obtenir une deuxième séparation.	TA pendant 5 minutes	TA pendant 5 minutes
9	Ramasser l'aimant et, dans un seul mouvement continu, inverser l'aimant et le tube à essai** et verser la suspension cellulaire enrichie dans un nouveau tube à essai.	Les cellules isolées sont prêtes à l'emploi	Utiliser un nouveau tube à essai de 14 mL
10	Retirer le tube à essai de l'aimant et placer le nouveau tube à essai de l'étape 9 (sans le couvercle) dans l'aimant, puis incuber en vue d'obtenir une troisième séparation.	---	TA pendant 5 minutes
11	Ramasser l'aimant et, dans un seul mouvement continu, inverser l'aimant et le tube à essai** et verser la suspension cellulaire enrichie dans un nouveau tube à essai.	---	Les cellules isolées sont prêtes à l'emploi

TA – température ambiante (entre 15 et 25 °C)

* À la suite de la première séparation magnétique, les cellules recueillies peuvent contenir un volume important de globules rouges et peuvent sembler identiques à l'échantillon de sang total humain non traité d'origine.

** Pour réduire au minimum la contamination des globules rouges dans les cellules isolées, verser l'échantillon le long d'une zone propre du tube à essai (c.-à-d. du côté opposé à celui qui a été utilisé pour verser l'échantillon dans le tube à essai).



Tableau 2. Protocole du Kit d'Isolément de Cellules B par épreuve de Compatibilité Croisée de l'Antigène HLA EasySep™ pour SANG TOTAL ou COUCHE LEUCOCYTO-PLAQUETTAIRE

ÉTAPE	INSTRUCTIONS	AIMANTS EASYSEP™		
		EasyEights™ (n° de catalogue 18103)	Easy 50 (n° de catalogue 18002)	
		Tube de 5 mL	Tube de 14 mL	
1	Prélever l'échantillon dans la fourchette de volume prescrite.	De 0,5 à 1,5 mL	De 1,5 à 7 mL	De 7 à 30 mL
	Ajouter l'échantillon au tube à essai prescrit.	Tube à essai à fond rond en polystyrène de 5 mL (12 x 75 mm) (p. ex., n° de catalogue 38007)	Tube à essai à fond rond en polystyrène de 14 mL (17 x 95 mm) (p. ex., n° de catalogue 38008)	Tube à essai conique de 50 mL (p. ex., n° de catalogue 38010)
2	Vortex RapidSpheres™. REMARQUE : Les particules doivent paraître uniformément dispersées.	30 secondes	30 secondes	30 secondes
3	Ajouter le cocktail d'isolement à l'échantillon.	50 µL/mL d'échantillon	50 µL/mL d'échantillon	50 µL/mL d'échantillon
4	Ajouter RapidSpheres™ à l'échantillon.	50 µL/mL d'échantillon	50 µL/mL d'échantillon	50 µL/mL d'échantillon
	Mélanger et incuber.	TA pendant 5 minutes	TA pendant 5 minutes	TA pendant 5 minutes
5	Ajouter le milieu recommandé jusqu'à obtention du volume d'échantillon indiqué. Mélanger doucement par pipetage deux ou trois fois.	Remplir jusqu'à 2,5 mL	• Remplir jusqu'au double de volume pour les échantillons ≤ 5 mL • Remplir jusqu'à 10 mL pour les échantillons > 5 mL	• Remplir jusqu'au double de volume pour les échantillons ≤ 25 mL • Remplir jusqu'à 50 mL pour les échantillons > 25 mL
	Placer le tube à essai (sans le couvercle) dans l'aimant et incuber.	TA pendant 5 minutes	TA pendant 5 minutes	TA pendant 10 minutes
6	Pipeter*** soigneusement (ne pas verser) la suspension cellulaire enrichie dans un nouveau tube à essai. REMARQUE : Prélever la fraction claire complète, du haut en bas. Pour obtenir une récupération optimale, prélever également une petite quantité de globules rouges (jusqu'à 10 % du volume initial de l'échantillon).	Utiliser un nouveau tube à essai de 5 mL	Utiliser un nouveau tube à essai de 14 mL	Utiliser un nouveau tube à essai de 50 mL
7	Ajouter RapidSpheres™ au nouveau tube à essai contenant les cellules enrichies.	Utiliser le même volume qu'à l'étape 4	Utiliser le même volume qu'à l'étape 4	Utiliser le même volume qu'à l'étape 4
	Mélanger et incuber.	TA pendant 5 minutes	TA pendant 5 minutes	TA pendant 5 minutes
8	Retirer le tube à essai de l'aimant et placer le tube à essai de l'étape 7 (sans le couvercle) dans l'aimant, puis incuber en vue d'obtenir une deuxième séparation.	TA pendant 5 minutes	TA pendant 5 minutes	TA pendant 5 minutes
9	Pipeter*** soigneusement (ne pas verser) la suspension cellulaire enrichie dans un nouveau tube à essai. REMARQUE : Ne prélever que la fraction claire.	Utiliser un nouveau tube à essai de 5 mL	Utiliser un nouveau tube à essai de 14 mL	Utiliser un nouveau tube à essai de 50 mL
10	Retirer le tube à essai de l'aimant et placer le nouveau tube à essai de l'étape 9 (sans le couvercle) qui contient les cellules enrichies dans l'aimant, puis incuber en vue d'obtenir une troisième séparation.	TA pendant 5 minutes	TA pendant 5 minutes	TA pendant 5 minutes
11	Pipeter*** soigneusement (ne pas verser) la suspension cellulaire enrichie dans un nouveau tube à essai. REMARQUE : Ne prélever que la fraction claire.	Les cellules isolées sont prêtes à l'emploi	Les cellules isolées sont prêtes à l'emploi	Les cellules isolées sont prêtes à l'emploi

TA – température ambiante (entre 15 et 25 °C)

*** Prélever le surnageant complet, en une seule fois, dans une seule et même pipette (p. Ex., pour un tube à essai de 5 mL EasyEights™, utiliser une pipette sérologique de 2 mL [n° de catalogue 38002]; pour un tube à essai de 13 mL EasyEights™, utiliser une pipette sérologique de 10 mL [n° de catalogue 38004]).

Tableau 3. Protocole du Kit d'Isolément de Cellules B par épreuve de Compatibilité Croisée de l'Antigène HLA EasySep™ pour RATE ou GANGLION LYMPHATIQUE

		AIMANTS EASYSEP™	
ÉTAPE	INSTRUCTIONS	 EasySep™ (n° de catalogue 18000)	 "The Big Easy" (n° de catalogue 18001)
1	Prélever l'échantillon dans la fourchette de volume prescrite.	De 0,5 à 1,5 mL	De 1 à 7 mL
	Ajouter l'échantillon au tube à essai prescrit.	Tube à essai à fond rond en polystyrène de 5 mL (12 x 75 mm) (p. ex., n° de catalogue 38007)	Tube à essai à fond rond en polystyrène de 14 mL (17 x 95 mm) (p. ex., n° de catalogue 38008)
2	Ajouter le cocktail d'isolement à l'échantillon.	50 µL/mL d'échantillon	50 µL/mL d'échantillon
	Mélanger et incuber.	TA pendant 5 minutes	TA pendant 5 minutes
3	Vortex RapidSpheres™. REMARQUE : Les particules doivent paraître uniformément dispersées.	30 secondes	30 secondes
4	Ajouter RapidSpheres™ à l'échantillon. Mélanger doucement par pipetage deux ou trois fois.	50 µL/mL d'échantillon	50 µL/mL d'échantillon
5	Ajouter le milieu recommandé jusqu'à obtention du volume d'échantillon indiqué.	Remplir jusqu'à 2,5 mL	• Remplir jusqu'au double de volume pour les échantillons ≤ 5 mL • Remplir jusqu'à 10 mL pour les échantillons > 5 mL
	Placer le tube à essai (sans le couvercle) dans l'aimant et incuber.	TA pendant 3 minutes	TA pendant 3 minutes
6	Ramasser l'aimant et, dans un seul mouvement continu, inverser l'aimant et le tube à essai, puis verser la suspension cellulaire enrichie dans un nouveau tube à essai.	Utiliser un nouveau tube à essai de 5 mL	Utiliser un nouveau tube à essai de 14 mL
7	Ajouter RapidSpheres™ au nouveau tube à essai contenant les cellules enrichies. Mélanger doucement par pipetage deux ou trois fois.	Utiliser le même volume qu'à l'étape 4	Utiliser le même volume qu'à l'étape 4
8	Retirer le tube à essai de l'aimant et placer le tube à essai de l'étape 7 (sans le couvercle) dans l'aimant, puis incuber en vue d'obtenir une deuxième séparation.	TA pendant 3 minutes	TA pendant 3 minutes
9	Ramasser l'aimant et, dans un seul mouvement continu, inverser l'aimant et le tube à essai, puis verser la suspension cellulaire enrichie dans un nouveau tube à essai.	Les cellules isolées sont prêtes à l'emploi	Les cellules isolées sont prêtes à l'emploi

TA – température ambiante (entre 15 et 25 °C)



Tableau 4. Protocole du Kit d'isolement de Cellules B par épreuve de Compatibilité Croisée de l'Antigène HLA EasySep™ pour RATE ou GANGLION LYMPHATIQUE

ÉTAPE	INSTRUCTIONS	AIMANTS EASYSEP™	
		EasyEights™ (n° de catalogue 18103)	
		Tube de 5 mL	Tube de 14 mL
1	Prélever l'échantillon dans la fourchette de volume prescrite.	De 0,5 à 1,5 mL	De 1 à 7 mL
	Ajouter l'échantillon au tube à essai prescrit.	Tube à essai à fond rond en polystyrène de 5 mL (12 x 75 mm) (p. ex., n° de catalogue 38007)	Tube à essai à fond rond en polystyrène de 14 mL (17 x 95 mm) (p. ex., n° de catalogue 38008)
2	Ajouter le cocktail d'isolement à l'échantillon.	50 µL/mL d'échantillon	50 µL/mL d'échantillon
	Mélanger et incub.	TA pendant 5 minutes	TA pendant 5 minutes
3	Vortex RapidSpheres™. REMARQUE : Les particules doivent paraître uniformément dispersées.	30 secondes	30 secondes
4	Ajouter RapidSpheres™ à l'échantillon. Mélanger doucement par pipetage deux ou trois fois.	50 µL/mL d'échantillon	50 µL/mL d'échantillon
5	Ajouter le milieu recommandé jusqu'à obtention du volume d'échantillon indiqué. Mélanger doucement par pipetage deux ou trois fois.	Remplir jusqu'à 2,5 mL	• Remplir jusqu'au double de volume pour les échantillons ≤ 5 mL • Remplir jusqu'à 10 mL pour les échantillons > 5 mL
	Placer le tube à essai (sans le couvercle) dans l'aimant et incub.	TA pendant 3 minutes	TA pendant 3 minutes
6	Pipeter*** soigneusement (ne pas verser) la suspension cellulaire enrichie dans un nouveau tube à essai. REMARQUE : Prélever la fraction claire complète, du haut en bas. Pour obtenir une récupération optimale, prélever également une petite quantité de globules rouges, le cas échéant (jusqu'à 10 % du volume initial de l'échantillon).	Utiliser un nouveau tube à essai de 5 mL	Utiliser un nouveau tube à essai de 14 mL
7	Ajouter RapidSpheres™ au nouveau tube à essai contenant les cellules enrichies. Mélanger doucement par pipetage deux ou trois fois.	Utiliser le même volume qu'à l'étape 4	Utiliser le même volume qu'à l'étape 4
8	Retirer le tube à essai de l'aimant et placer le tube à essai de l'étape 7 (sans le couvercle) dans l'aimant, puis incub en vue d'obtenir une deuxième séparation.	TA pendant 3 minutes	TA pendant 3 minutes
9	Pipeter*** soigneusement (ne pas verser) la suspension cellulaire enrichie dans un nouveau tube à essai. REMARQUE : Ne prélever que la fraction claire.	Utiliser un nouveau tube à essai de 5 mL Pour le ganglion lymphatique: Les cellules isolées sont prêtes à l'emploi	Utiliser un nouveau tube à essai de 14 mL Pour le ganglion lymphatique: Les cellules isolées sont prêtes à l'emploi
10	Retirer le tube à essai de l'aimant et placer le nouveau tube à essai de l'étape 9 (sans le couvercle) qui contient les cellules enrichies dans l'aimant, puis incub en vue d'obtenir une troisième séparation.	Pour la rate: TA pendant 3 minutes	Pour la rate: TA pendant 3 minutes
11	Pipeter*** soigneusement (ne pas verser) la suspension cellulaire enrichie dans un nouveau tube à essai. REMARQUE : Ne prélever que la fraction claire.	Pour la rate: Les cellules isolées sont prêtes à l'emploi	Pour la rate: Les cellules isolées sont prêtes à l'emploi

TA – température ambiante (entre 15 et 25 °C)

*** Prélever le surnageant complet, en une seule fois, dans une seule et même pipette (p. ex., pour un tube à essai de 5 mL EasyEights™, utiliser une pipette sérologique de 2 mL [n° de catalogue 38002]; pour un tube à essai de 13 mL EasyEights™, utiliser une pipette sérologique de 10 mL [n° de catalogue 38004]).



Mode d'Emploi – Protocole Entièrement Automatisé RoboSep™

Voir la page 1 pour consulter la préparation de l'échantillon et le milieu recommandé. Se reporter aux tableaux 5 et 6 pour obtenir des instructions détaillées concernant la procédure RoboSep™.

Tableau 5. Protocole du Kit d'Isolément de Cellules B par Épreuve de Compatibilité Croisée de l'Antigène HLA RoboSep™ pour SANG TOTAL, RATE ou GANGLION LYMPHATIQUE

ÉTAPE	INSTRUCTIONS	RoboSep™ (n°s de catalogue 20000 et 21000)	
1	Préparer l'échantillon à la concentration cellulaire indiquée dans la fourchette de volume prescrite.	Pour la rate ou le ganglion lymphatique : De 0,5 à 6 mL à 1 à 100 x 10 ⁶ cellules/mL	
	Ajouter l'échantillon au tube à essai prescrit.	Pour le sang : De 0,5 à 6 mL Tube à essai à fond rond en polystyrène de 14 mL (17 x 95 mm) (p. ex., n° de catalogue 38008)	
2	Sélectionner le protocole.	EasySep™ Direct HLA Crossmatch B Cell Isolation Kit – For WB, Spleen, LN	
3	Vortex RapidSpheres™. REMARQUE : Les particules doivent paraître uniformément dispersées.	30 secondes	
4	Charger la corbeille.	Suivre les messages de guidage à l'écran	
	Lancer le protocole.	Appuyer sur le bouton vert "Run"	
5	Décharger la corbeille lorsque le passage est terminé.	Les cellules isolées sont prêtes à l'emploi	

Tableau 6. Protocole du Kit d'Isolément de Cellules B par Épreuve de Compatibilité Croisée de l'Antigène HLA RoboSep™ pour COUCHE LEUCOCYTO-PLAQUETTAIRE

ÉTAPE	INSTRUCTIONS	RoboSep™ (n°s de catalogue 20000 et 21000)	
1	Préparer l'échantillon dans la fourchette de volume prescrite.	De 2 à 6 mL	
	Ajouter l'échantillon au tube à essai prescrit.	Tube à essai à fond rond en polystyrène de 14 mL (17 x 95 mm) (p. ex., n° de catalogue 38008)	
2	Sélectionner le protocole.	EasySep™ Direct HLA Crossmatch B Cell Isolation Kit - For BC	
3	Vortex RapidSpheres™. REMARQUE : Les particules doivent paraître uniformément dispersées.	30 secondes	
4	Charger la corbeille.	Suivre les messages de guidage à l'écran	
	Lancer le protocole.	Appuyer sur le bouton vert "Run"	
5	Décharger la corbeille lorsque le passage est terminé.	Les cellules isolées sont prêtes à l'emploi	

Notes et Conseils

ÉLIMINATION DES GLOBULES ROUGES RESTANTS DANS LES CELLULES ISOLÉES

En général, aucune déplétion des globules rouges supplémentaire n'est requise à la suite de l'isolement des cellules. Si des globules rouges résiduels sont visibles dans le fragment de cellules isolées à la suite de la centrifugation à la fin du protocole, remettre la solution en suspension dans un petit volume (de 0,2 à 2,5 mL) du milieu recommandé ou du milieu de culture souhaité, et placer dans un aimant EasySep™ de taille inférieure en vue d'une séparation supplémentaire de 5 minutes. Prélever le surnageant; les cellules isolées sont désormais prêtes à l'emploi dans les applications en aval. Il est également possible de lyser les globules rouges résiduels au moyen d'une solution de chlorure d'ammonium (n° de catalogue 07800).

ÉVALUATION DE LA PURETÉ

Pour évaluer la pureté des cellules B par cytométrie en flux, utiliser les clones d'anticorps conjugués à des fluorochromes suivants :

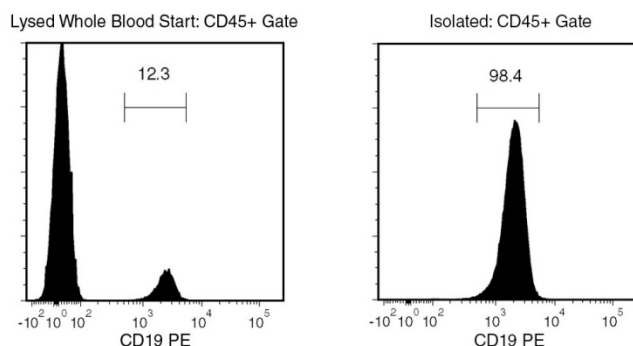
- Anti-Human CD19 Antibody, Clone H1B19 (n° de catalogue 60005), et
- Anti-Human CD45 Antibody, Clone HI30 (n° de catalogue 60018)

REMARQUE : Il est recommandé d'évaluer la pureté sur les cellules positives en CD45 afin d'exclure les débris, les plaquettes et les globules rouges.



Données

À partir de sang total humain provenant de donneurs normaux en bonne santé, la teneur typique en cellules B (CD19+) de la fraction isolée finale non lysée est de 89 - 99,8% (médiane en CD45).



Dans l'exemple ci-dessus, la teneur en cellules B (CD19+) de l'échantillon de départ de sang total lysé et de la fraction isolée finale non lysée correspond respectivement à 12,3% et à 98,4% (médiane en CD45).

Assistance Technique

Pour obtenir une assistance technique, prendre contact avec nous à l'adresse techsupport@stemcell.com ou composer soit le +1 604 877 0713, soit le numéro sans frais en Europe 00800 7836 2355. Pour obtenir de plus amples renseignements, se rendre sur le site www.stemcell.com.

Si vous avez besoin d'une copie imprimée ou d'une version de ce document dans une certaine langue, prière de prendre contact avec l'assistance technique.

REF Référence du catalogue	LOT Numéro de lot	 Utiliser avant: YYYY-MM
 Attention: voir notice d'instructions	IVD Dispositif médical de diagnostic in vitro	 Limites de températures
 Consulter le mode d'emploi	 Ne pas réutiliser	 Contenu suffisant pour n tests
CE Marquage CE	 Fabriquant (nom et adresse)	EC REP Représentant CE autorisé au sein de la Communauté européenne

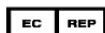
LE SYSTÈME DE GESTION DE LA QUALITÉ DE STEMCELL TECHNOLOGIES INC. EST CERTIFIÉ ISO 13485. LES PRODUITS SONT RÉSERVÉS À L'USAGE DIAGNOSTIQUE PROFESSIONNEL *IN VITRO*.

Copyright © 2017 de STEMCELL Technologies Inc. Tous droits réservés, y compris les graphiques et les images. STEMCELL Technologies & Design, STEMCELL Shield Design, Scientists Helping Scientists, EasyEights, EasySep, RapidSpheres et RoboSep sont des marques de commerce de STEMCELL Technologies Canada Inc. Toutes les autres marques de commerce appartiennent à leurs propriétaires respectifs. STEMCELL a déployé tous les efforts raisonnables pour s'assurer que les renseignements fournis par STEMCELL et ses fournisseurs sont corrects; toutefois, la société ne donne aucune garantie ni ne fait aucune déclaration concernant l'exactitude ou l'exhaustivité desdits renseignements.



STEMCELL Technologies Inc | 1618 Station Street, Vancouver, BC | V6A 1B6 | Canada | www.stemcell.com

For Technical Assistance
Tel: +1 604 877 0713
European toll-free number: 00800 7836 2355
e-mail: techsupport@stemcell.com



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hanovre • Germany



Document #DX21446
Version 1.0.0
2017



Selección negativa
No. catálogo 89684

EasySep™ Direct HLA Crossmatch B Cell Isolation Kit

Para procesar 100 mL de sangre total



Scientists Helping Scientists™ | [WWW.STEMCELL.COM](http://www.stemcell.com)

TOLL FREE PHONE 1 800 667 0322 • PHONE +1 604 877 0713
INFO@STEMCELL.COM • TECHSUPPORT@STEMCELL.COM
FOR GLOBAL CONTACT DETAILS VISIT OUR WEBSITE

Documento no. DX21446 | Versión 1_0_0

ESPAÑOL

Uso Previsto

Para la separación de células B de muestras de sangre total, bazo y ganglio linfático.

Descripción del Producto

Este kit elimina las células no B por selección negativa inmunomagnética con anticuerpos que reconocen marcadores de superficie de célula específicos. Las células no deseadas son identificadas con anticuerpos y con EasySep™ Direct RapidSpheres™ y son separadas utilizando un imán EasySep™. Las células deseadas simplemente se recolectan en un nuevo tubo y quedan disponibles de inmediato para utilizarse para aplicaciones de diagnóstico in vitro.

Control de Calidad

Los productos EasySep™ Direct se fabrican empleando una técnica aséptica y procesos estrictamente controlados.

La esterilidad de cada lote de cóctel y partículas de EasySep™ Direct se prueba según métodos USP y su rendimiento mediante ensayos de separación de células.

Almacenamiento y Estabilidad

Almacénese de 2 a 8 °C. Este producto puede transportarse a temperatura de 15 a 25 °C, pero debe refrigerarse a su recibo. No congelar. El producto es estable a temperaturas de 2 a 8 °C hasta su fecha de vencimiento (EXP) especificada en la etiqueta.

Advertencias y Precauciones

1. Para diagnósticos *in vitro* realizados por profesionales de laboratorio.
2. No utilizar si el contenido del vial se ha fugado. El producto no utilizado puede desecharse según los procedimientos estándar de laboratorio para líquidos no peligrosos.
3. Este producto debe ser manipulado por un personal capacitado que mantenga buenas prácticas de laboratorio. Después de añadir el producto a células humanas, trate la suspensión como material de riesgo biológico. La manipulación de reactivos y la eliminación de desechos deben cumplir con las regulaciones nacionales, estatales y locales.
4. Este producto puede causar irritación en los ojos, el sistema respiratorio y la piel. Este producto también puede ser perjudicial si se ingiere. Evite el contacto del producto con la piel, los ojos, así como su inhalación e ingestión.
5. RoboSep™ se provee como equipo general de laboratorio. El usuario es responsable de validar el RoboSep™ para que cumpla con requisitos específicos.
6. El usuario es responsable de validar el rendimiento de las células separadas en ensayos subsiguientes.

Descripción de Componentes

NOMBRE DE COMPONENTE	COMPONENTE NO.	CANTIDAD	FORMATO
EasySep™ Direct HLA Crossmatch B Cell Isolation Cocktail	89684C	2 x 2,5 mL	Una combinación de anticuerpos monoclonales en PBS
EasySep™ Direct RapidSpheres™ 50302	50302	4 x 2,5 mL	Una suspensión de partículas magnéticas y anticuerpos monoclonales en PBS

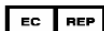
PBS - tampón fosfato salino

Precipitados pueden formarse en el vial del cóctel, pero esto no afectará el rendimiento del producto.



STEMCELL Technologies Inc | 1618 Station Street, Vancouver, BC | V6A 1B6 | Canadá | www.stemcell.com

For Technical Assistance
Tel.: +1.604.877.0713
European toll-free number: 00800 7836 2355
e-mail: techsupport@stemcell.com



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover • Germany



Documen #DX21446
Version 1.0.0
2017

Preparación de la Muestra

Para un agotamiento óptimo de glóbulos rojos, recolecte la sangre con heparina o ACD (ácido-citrato-dextrosa) como anticoagulante.

Para lograr la mejor recuperación, utilice sangre humana total no procesada. La recuperación de las células enriquecidas deseadas disminuye en muestras que tienen más de 24 horas.

El volumen de muestra que puede procesarse depende del imán EasySep™ que se use para el procedimiento de enriquecimiento. Las muestras se deben colocar en el tubo adecuado para que quepa dentro del imán EasySep™ correspondiente (véanse las tablas 1 a 4).

CAPA LEUCOCÍTICA (BUFFY COAT)

1. Añada un volumen igual de un medio recomendado a la sangre total.
2. Centrifugue a 800 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente (15 - 25 °C), con el freno desconectado.
3. Retire la banda leucocítica (es decir, la capa leucocítica o *buffy coat*), y además una pequeña cantidad de plasma y de glóbulos rojos concentrados. El objetivo es concentrar los leucocitos aproximadamente 5 veces mientras se mantiene el mismo hematocrito.
4. Transfiera un máximo de 7 mL de capa leucocítica al tubo adecuado (véanse las tablas 1, 2 y 6).

BAZO o GANGLIO LINFÁTICO

Homogeneice el bazo o el ganglio linfático en un PBS o solución salina equilibrada de Hanks (Hanks' Balanced Salt Solution, HBSS) que contenga suero bovino fetal (FBS) al 2 %. Elimine los agregados o desechos pasando la suspensión de células por un filtro de malla de nailon húmedo de 100 µm. Aclare el filtro con PBS o HBSS que contenga FBS al 2 %. Centrifugue a 300 x g durante 10 minutos y resuspenda a $1 - 100 \times 10^6$ células/mL en el medio recomendado.

Medio Recomendado

D-PBS (sin Ca++ y Mg++; no. catálogo 37350)

Materiales Necesarios que no se Proveen

Imán EasySep™ (no. catálogo 18000), Imán "The Big Easy" EasySep™ (no. catálogo 18001), Imán Easy 50 EasySep™ (no. catálogo 18002), Imán EasyEights™ EasySep™ (no. catálogo 18103), o RoboSep™-S (no. catálogo 21000).



Instrucciones de Uso – Protocolos Manuales EasySep™

Para información sobre la preparación de la muestra y el medio recomendado, consulte la página 1. Consulte las tablas 1 a 4 para instrucciones detalladas sobre el procedimiento EasySep™ para cada imán.

Tabla 1. Protocolo de Kit EasySep™ Direct para Separación de Células B por Prueba Cruzada de HLA para SANGRE TOTAL o CAPA LEUCOCÍTICA

PASO	INSTRUCCIONES	IMANES EASYSEP™	
		 EasySep™ (no. de catálogo 18000)	“The Big Easy” (no. catálogo 18001) 
1	Recolecte la muestra dentro del rango de volumen.	0,5 - 1,5 mL	1 - 7 mL
	Añada la muestra al tubo adecuado.	Tubo de 5 mL (12 x 75 mm), de poliestireno con fondo circular (p. ej., no. catálogo 38007)	Tubo de 14 mL (17 x 95 mm), de poliestireno con fondo circular (p. ej., no. catálogo 38008)
2	Vortex RapidSpheres™. NOTA: Las partículas deben aparecer uniformemente dispersas.	30 segundos	30 segundos
3	Añada el cóctel de separación a la muestra.	50 µL/mL de muestra	50 µL/mL de muestra
4	Añada RapidSpheres™ a la muestra.	50 µL/mL de muestra	50 µL/mL de muestra
	Mezcle e incube.	TA por 5 minutos	TA por 5 minutos
5	Añada el medio recomendado para rellenar la muestra hasta el volumen indicado. Mezcle suavemente pipeteando hacia arriba y hacia abajo 2 o 3 veces.	Rellene hasta 2,5 mL	• Rellene hasta duplicar el volumen en muestras ≤ 5 mL • Rellene hasta 10 mL para muestras > 5 mL
	Coloque el tubo (sin tapa) dentro del imán e incube.	TA por 5 minutos	TA por 5 minutos
6	Coja el imán y con un movimiento continuo, voltee el tubo y el imán vertiendo la suspensión* de células enriquecidas dentro de un nuevo tubo.	Use un nuevo tubo de 5 mL	Use un nuevo tubo de 14 mL
7	Añada RapidSpheres™ al nuevo tubo que contiene las células enriquecidas.	Utilice el mismo volumen del paso 4	Utilice el mismo volumen del paso 4
	Mezcle e incube.	TA por 5 minutos	TA por 5 minutos
8	Retire el tubo del imán y ponga el tubo del paso 7 (sin tapa) dentro del imán e incube para una segunda separación.	TA por 5 minutos	TA por 5 minutos
9	Coja el imán y con movimiento continuo, voltee el tubo y el imán** vertiendo la suspensión de células enriquecidas dentro de un nuevo tubo.	Las células separadas están listas para usarse	Use un nuevo tubo de 14 mL
10	Retire el tubo del imán y ponga el nuevo tubo del paso 9 (sin tapa) dentro del imán e incube para una tercera separación.	---	TA por 5 minutos
11	Coja el imán y con movimiento continuo, voltee el tubo y el imán** vertiendo la suspensión de células enriquecidas dentro de un nuevo tubo.	---	Las células separadas están listas para usarse

TA - temperatura ambiente (15 - 25 °C)

* Después de la primera separación magnética, las células pueden contener una cantidad considerable de glóbulos rojos y pueden tener una apariencia similar a la muestra original no procesada de glóbulos rojos humanos.

** A fin de minimizar la contaminación por glóbulos rojos en las células separadas, vierta la muestra por el lado limpio del tubo (es decir, el lado opuesto por donde se vertió la muestra).

Tabla 2. Protocolo de Kit EasySep™ Direct para Separación de Células B por Prueba Cruzada de HLA para SANGRE TOTAL o CAPA LEUCOCÍTICA

PASO	INSTRUCCIONES	IMANES EASYSEP™		
		EasyEights™ (no. catálogo 18103)		Easy 50 (no. catálogo 18002)
		 Tubo de 5 mL	 Tubo de 14 mL	
1	Recolecte la muestra dentro del rango de volumen.	0,5 - 1,5 mL	1 - 7 mL	7 - 30 mL
	Añada la muestra al tubo adecuado.	Tubo de 5 mL (12 x 75 mm), de poliestireno con fondo circular (p. ej., no. catálogo 38007)	Tubo de 14 mL (17 x 95 mm), de poliestireno con fondo circular (p. ej., no. catálogo 38008)	Tubo cónico de 50 mL (p. ej., no. catálogo 38010)
2	Vortex RapidSpheres™. NOTA: Las partículas deben aparecer uniformemente dispersas.	30 segundos	30 segundos	30 segundos
3	Añada el cóctel de separación a la muestra.	50 µL/mL de muestra	50 µL/mL de muestra	50 µL/mL de muestra
4	Añada RapidSpheres™ a la muestra.	50 µL/mL de muestra	50 µL/mL de muestra	50 µL/mL de muestra
	Mezcle e incube.	TA por 5 minutos	TA por 5 minutos	TA por 5 minutos
5	Añada el medio recomendado para rellenar la muestra hasta el volumen indicado. Mezcle suavemente pipeteando hacia arriba y hacia abajo 2 o 3 veces.	Rellene hasta 2,5 mL	• Rellene hasta duplicar el volumen en muestras ≤ 5 mL • Rellene hasta 10 mL para muestras > 5 mL	• Rellene hasta duplicar el volumen en muestras ≤ 25 mL • Rellene hasta 50 mL para muestras > 25 mL
	Coloque el tubo (sin tapa) dentro del imán e incube.	TA por 5 minutos	TA por 5 minutos	TA por 10 minutos
6	Con cuidado, pipetee*** (no vierta) la suspensión de células enriquecidas dentro de un nuevo tubo. NOTA: Recolecte toda la fracción transparente desde arriba hacia abajo. Para una lograr una recuperación óptima, también recolecte un volumen pequeño de glóbulos rojos (hasta un 10 % del volumen de la muestra inicial).	Use un nuevo tubo de 5 mL	Use un nuevo tubo de 14 mL	Use un nuevo tubo de 50 mL
7	Añada RapidSpheres™ al nuevo tubo que contiene las células enriquecidas.	Utilice el mismo volumen del paso 4	Utilice el mismo volumen del paso 4	Utilice el mismo volumen del paso 4
	Mezcle e incube.	TA por 5 minutos	TA por 5 minutos	TA por 5 minutos
8	Retire el tubo del imán y ponga el tubo del paso 7 (sin tapa) dentro del imán e incube para una segunda separación.	TA por 5 minutos	TA por 5 minutos	TA por 5 minutos
9	Con cuidado, pipetee*** (no vierta) la suspensión de células enriquecidas dentro de un nuevo tubo. NOTA: Recolecte solo la fracción transparente.	Use un nuevo tubo de 5 mL	Use un nuevo tubo de 14 mL	Use un nuevo tubo de 50 mL
10	Retire el tubo del imán y ponga el nuevo tubo del paso 9 (sin tapa) que contiene las células enriquecidas dentro del imán e incube para una tercera separación.	TA por 5 minutos	TA por 5 minutos	TA por 5 minutos
11	Con cuidado, pipetee*** (no vierta) la suspensión de células enriquecidas dentro de un nuevo tubo. NOTA: Recolecte solo la fracción transparente.	Las células separadas están listas para usarse	Las células separadas están listas para usarse	Las células separadas están listas para usarse

TA - temperatura ambiente (15 - 25 °C)

*** Recolecte todo el sobrenadante de una vez, en una sola pipeta (p. ej., para un tubo EasyEights™ de 5 mL, use una pipeta serológica de 2 mL [no. catálogo 38002]; para un tubo EasyEights™ de 14 mL, use una pipeta serológica de 10 mL [no. catálogo 38004]).

Tabla 3. Protocolo de Kit EasySep™ Direct para Separación de Células B por Prueba Cruzada de HLA para BAZO o GANGLIO LINFÁTICO

		IMANES EASYSEP™	
PASO	INSTRUCCIONES	 EasySep™ (no. de catálogo 18000)	"The Big Easy" (no. catálogo 18001) 
1	Recolecte la muestra dentro del rango de volumen.	0,5 - 1,5 mL	1 - 7 mL
	Añada la muestra al tubo adecuado.	Tubo de 5 mL (12 x 75 mm), de poliestireno con fondo circular (p. ej., no. catálogo 38007)	Tubo de 14 mL (17 x 95 mm), de poliestireno con fondo circular (p. ej., no. catálogo 38008)
2	Añada el cóctel de separación a la muestra.	50 µL/mL de muestra	50 µL/mL de muestra
	Mezcle e incube.	TA por 5 minutos	TA por 5 minutos
3	Vortex RapidSpheres™. NOTA: Las partículas deben aparecer uniformemente dispersas.	30 segundos	30 segundos
4	Añada RapidSpheres™ a la muestra. Mezcle suavemente pipeteando hacia arriba y hacia abajo 2 o 3 veces.	50 µL/mL de muestra	50 µL/mL de muestra
5	Añada el medio recomendado para rellenar la muestra hasta el volumen indicado.	Rellene hasta 2,5 mL	• Rellene hasta duplicar el volumen en muestras ≤ 5 mL • Rellene hasta 10 mL para muestras > 5 mL
	Coloque el tubo (sin tapa) dentro del imán e incube.	TA por 3 minutos	TA por 3 minutos
6	Coja el imán y con un movimiento continuo, voltee el tubo y el imán vertiendo la suspensión de células enriquecidas dentro de un nuevo tubo.	Use un nuevo tubo de 5 mL	Use un nuevo tubo de 14 mL
7	Añada RapidSpheres™ al nuevo tubo que contiene las células enriquecidas. Mezcle suavemente pipeteando hacia arriba y hacia abajo 2 o 3 veces.	Utilice el mismo volumen del paso 4	Utilice el mismo volumen del paso 4
8	Retire el tubo del imán y ponga el tubo del paso 7 (sin tapa) dentro del imán e incube para una segunda separación.	TA por 3 minutos	TA por 3 minutos
9	Coja el imán y con un movimiento continuo, voltee el tubo y el imán vertiendo la suspensión de células enriquecidas dentro de un nuevo tubo.	Las células separadas están listas para usarse	Las células separadas están listas para usarse

TA - temperatura ambiente (15 - 25 °C)

Tabla 4. Protocolo de Kit EasySep™ Direct para Separación de Células B por Prueba Cruzada de HLA para BAZO o GANGLIO LINFÁTICO

		IMANES EASYSEP™	
PASO	INSTRUCCIONES	EasyEights™ (no. catálogo 18103)	
		Tubo de 5 mL	Tubo de 14 mL
1	Recolecte la muestra dentro del rango de volumen.	0,5 - 1,5 mL	1 - 7 mL
	Añada la muestra al tubo adecuado	Tubo de 5 mL (12 x 75 mm), de poliestireno con fondo circular (p. ej., no. catálogo 38007)	Tubo de 14 mL (17 x 95 mm), de poliestireno con fondo circular (p. ej., no. catálogo 38008)
2	Añada el cóctel de separación a la muestra.	50 µL/mL de muestra	50 µL/mL de muestra
	Mezcle e incube.	TA por 5 minutos	TA por 5 minutos
3	Vortex RapidSpheres™. NOTA: Las partículas deben aparecer uniformemente dispersas.	30 segundos	30 segundos
4	Añada RapidSpheres™ a la muestra. Mezcle suavemente pipeteando hacia arriba y hacia abajo 2 o 3 veces.	50 µL/mL de muestra	50 µL/mL de muestra
5	Añada el medio recomendado para rellenar la muestra hasta el volumen indicado. Mezcle suavemente pipeteando hacia arriba y hacia abajo 2 o 3 veces.	Rellene hasta 2,5 mL	• Rellene hasta duplicar el volumen en muestras ≤ 5 mL • Rellene hasta 10 mL para muestras > 5 mL
	Coloque el tubo (sin tapa) dentro del imán e incube.	TA por 3 minutos	TA por 3 minutos
6	Con cuidado, pipetee*** (no vierta) la suspensión de células enriquecidas dentro de un nuevo tubo. NOTA: Recolecte toda la fracción transparente desde arriba hacia abajo. Para una lograr una recuperación óptima, también recolecte (si existe) un volumen pequeño de glóbulos rojos (hasta un 10 % del volumen de la muestra inicial).	Use un nuevo tubo de 5 mL	Use un nuevo tubo de 14 mL
7	Añada RapidSpheres™ al nuevo tubo que contiene las células enriquecidas. Mezcle suavemente pipeteando hacia arriba y hacia abajo 2 o 3 veces.	Utilice el mismo volumen del paso 4	Utilice el mismo volumen del paso 4
8	Retire el tubo del imán y ponga el tubo del paso 7 (sin tapa) dentro del imán e incube para una segunda separación.	TA por 3 minutos	TA por 3 minutos
9	Con cuidado, pipetee*** (no vierta) la suspensión de células enriquecidas dentro de un nuevo tubo. NOTA: Recolecte solo la fracción transparente.	Use un nuevo tubo de 5 mL Para ganglio linfático: Las células separadas están listas para usars.	Use un nuevo tubo de 14 mL Para ganglio linfático: Las células separadas están listas para usarse
10	Retire el tubo del imán y ponga el nuevo tubo del paso 9 (sin tapa) que contiene las células enriquecidas dentro del imán e incube para una tercera separación.	Para bazo: TA por 3 minutos	Para bazo: TA por 3 minutos
11	Con cuidado, pipetee*** (no vierta) la suspensión de células enriquecidas dentro de un nuevo tubo. NOTA: Recolecte solo la fracción transparente.	Para bazo: Las células separadas están listas para usarse	Para bazo: Las células separadas están listas para usarse

TA - temperatura ambiente (15 - 25 °C)

*** Recolecte todo el sobrenadante de una vez en una sola pipeta (p. ej., para un tubo EasyEights™ de 5 mL, use una pipeta serológica de 2 mL [no. catálogo 38002]; para un tubo EasyEights™ de 14 mL, use una pipeta serológica de 10 mL [no. catálogo 38004]).

Instrucciones de Uso – Protocolo Completamente Automatizado RoboSep™

Para información sobre la preparación de la muestra y el medio recomendado, consulte la página 1. Consulte las tablas 5 y 6 para instrucciones detalladas sobre el procedimiento RoboSep™.

Tabla 5. Protocolo de Kit RoboSep™ Direct para Separación de Células B por Prueba Cruzada de HLA para SANGRE TOTAL, BAZO o GANGLIO LINFÁTICO

PASO	INSTRUCCIONES	RoboSep™ (no. catálogo 20000 y 21000)	
1	Prepare la muestra con la concentración de células indicada dentro del rango de volumen.	Para bazo o ganglio linfático: 0,5 - 6 mL a $1 - 100 \times 10^6$ células/mL	
	Añada la muestra al tubo adecuado.	Para sangre: 0,5 - 6 mL	
2	Seleccione el protocolo.	Tubo de 14 mL (17 x 95 mm), de poliestireno con fondo circular (p. ej., no. catálogo 38008)	
3	Vortex RapidSpheres™. NOTA: Las partículas deben aparecer uniformemente dispersas.	EasySep™ Direct HLA Crossmatch B Cell Isolation Kit – For WB, Spleen, LN	
4	Cargue el carrusel.	30 segundos	
	Inicie el protocolo.	Siga las indicaciones en pantalla	
5	Descargue el carrusel cuando termine el ciclo.	Pulse el botón verde “Run”	
		Las células separadas están listas para usarse	

Tabla 6. Protocolo de Kit RoboSep™ Direct para Separación de Células B por Prueba Cruzada de HLA para CAPA LEUCOCÍTICA

PASO	INSTRUCCIONES	RoboSep™ (no. catálogo 20000 y 21000)	
1	Prepare la muestra dentro del rango de volumen.	2 - 6 mL	
	Añada la muestra al tubo adecuado.	Tubo de 14 mL (17 x 95 mm), de poliestireno con fondo circular (p. ej., no. catálogo 38008)	
2	Seleccione el protocolo.	EasySep™ Direct HLA Crossmatch B Cell Isolation Kit - For BC	
3	Vortex RapidSpheres™. NOTA: Las partículas deben aparecer uniformemente dispersas.	30 segundos	
4	Cargue el carrusel.	Siga las indicaciones en pantalla	
	Inicie el protocolo.	Pulse el botón verde “Run”	
5	Descargue el carrusel cuando termine el ciclo.	Las células separadas están listas para usarse	

Notas y Consejos

ELIMINACIÓN DE GLÓBULOS ROJOS RESIDUALES EN LAS CÉLULAS SEPARADAS

Generalmente, después de la separación de células, no se requiere más agotamiento de glóbulos rojos. Si después de la centrifugación del final del protocolo se observan glóbulos rojos residuales en el pellet de células separadas, resuspenda un pequeño volumen (0,2 - 2,5 mL) del medio recomendado o del medio de cultivo deseado y póngalo en un imán EasySep™ más pequeño para una separación adicional de 5 minutos. Recolecte el sobrenadante y las células separadas estarán listas para usarse en aplicaciones subsiguientes. Los glóbulos rojos residuales pueden ser lisados con una solución de cloruro de amonio (no. catálogo 07800).

CÓMO EVALUAR LA PUREZA

Para la evaluación de la pureza de las células B por citometría de flujo, utilice los siguientes clones de anticuerpo conjugados con fluorocromo.

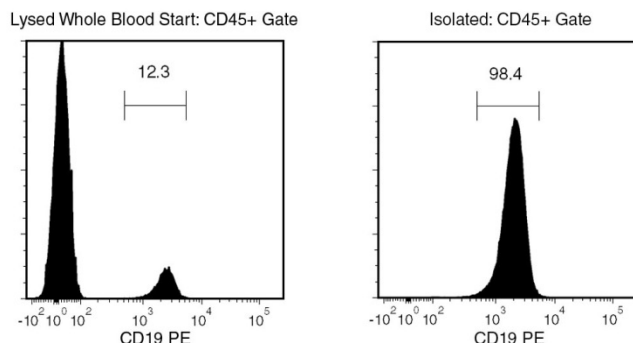
- Anti-Human CD19 Antibody, Clone HIB19 (no. catálogo 60005), y
- Anti-Human CD45 Antibody, Clone HI30 (no. catálogo 60018)

NOTA: Se recomienda evaluar la pureza de las células CD45-positivas para excluir desechos, plaquetas y glóbulos rojos.



Datos

Comenzando con sangre total humana de donantes saludables normales, el contenido de célula B (CD19+) típica de la fracción final separada no lisada es 89 - 99.8% (separada en CD45).



En el ejemplo anterior, el contenido de célula B (CD19+) de la muestra inicial lisada de sangre total y de la fracción final separada no lisada es de 12,3% y 98,4% (separada en CD45), respectivamente.

Asistencia Técnica

Para recibir asistencia técnica, contáctenos en techsupport@stemcell.com o llame al +1.604.877.0713 o al número gratuito en Europa 00800 7836 2355. Para obtener más información, visite www.stemcell.com.

Si usted necesita una copia impresa o una versión traducida de este documento, contacte con el departamento de asistencia técnica.

REF Número de catálogo o de referencia	LOT Código de lote	 Usar hasta: AAAA-MM
 Precaución, consultar los documentos adjuntos	IVD Dispositivo médico para diagnóstico in vitro	 Conservar dentro del rango de temperaturas
 Consulte las instrucciones de uso	 No reutilizar	 Contiene suficiente para pruebas n
CE Marca CE	 Identificación del fabricante (nombre y domicilio)	EC REP Representante autorizado para la Comunidad Europea

EL SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD DE STEMCELL TECHNOLOGIES INC. POSEE CERTIFICACIÓN ISO 13485. LOS PRODUCTOS SON PARA USO PROFESIONAL EN DIAGNÓSTICOS IN VITRO.

Copyright © 2017 de STEMCELL Technologies Inc. Todos los derechos reservados incluyendo los gráficos e imágenes. STEMCELL Technologies & Design, STEMCELL Shield Design, Scientists Helping Scientists, EasyEights, EasySep, RapidSpheres, y RoboSep son marcas comerciales de STEMCELL Technologies Canada Inc. Todas las demás marcas comerciales son propiedad de sus respectivos titulares. Si bien STEMCELL ha hecho todos los esfuerzos razonables para garantizar que la información proporcionada por STEMCELL y sus proveedores sea correcta, no garantiza ni se manifiesta en relación con la exactitud o integridad de tal información.



STEMCELL Technologies Inc | 1618 Station Street, Vancouver, BC | V6A 1B6 | Canadá | www.stemcell.com

For Technical Assistance
Tel.: +1.604.877.0713
European toll-free number: 00800 7836 2355
e-mail: techsupport@stemcell.com



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover • Germany



Document #DX21446
Version 1.0.0
2017



Selezione negativa

Nr. di catalogo 89684

EasySep™ Direct HLA Crossmatch B Cell Isolation Kit

Per il trattamento di 100 mL di sangue intero



Scientists Helping Scientists™ | WWW.STEMCELL.COM

TOLL FREE PHONE 1 800 667 0322 • PHONE +1 604 877 0713

INFO@STEMCELL.COM • TECHSUPPORT@STEMCELL.COM

FOR GLOBAL CONTACT DETAILS VISIT OUR WEBSITE

Nr. documento DX21446 | Versione 1_0_0

ITALIANO

Uso Previsto

Per l'isolamento di linfociti B da campioni di sangue intero, milza e linfonodi umani.

Descrizione del Prodotto

Questo kit marca i linfociti non B per la rimozione via selezione immunomagnetica negativa con anticorpi che riconoscono specifici marcatori cellulari superficiali. Le cellule indesiderate vengono etichettate con gli anticorpi e con le Direct RapidSpheres™ EasySep™, e separate usando un magnete EasySep™. Le cellule desiderate si raccolgono semplicemente in un'altra provetta e sono immediatamente disponibili per applicazioni diagnostiche a valle in vitro.

Controllo di Qualità

I prodotti EasySep™ Direct sono ottenuti usando tecniche asettiche e processi strettamente controllati.

Ciascun lotto di cocktail e particelle EasySep™ Direct è testato per la sterilità secondo le metodiche USP e per le prestazioni nelle analisi di isolamento cellulare.

Conservazione e Stabilità

Conservare a 2 - 8°C. Il prodotto può essere spedito a 15 - 25°C, ma va refrigerato al ricevimento. Non congelare. Prodotto stabile a 2 - 8°C fino alla data di scadenza (EXP) indicata sull'etichetta.

Avvertenze e Precauzioni

1. Per uso diagnostico in vitro da parte di tecnici di laboratorio professionisti.
2. Non usare se la fiala ha subito perdite di contenuto. Il prodotto non utilizzato può essere smaltito secondo le procedure standard di laboratorio per liquidi non pericolosi.
3. Questo prodotto dev'essere maneggiato da personale addestrato che rispetti le buone pratiche di laboratorio. Una volta che il prodotto sia stato aggiunto a cellule umane, trattare la sospensione come potenzialmente a rischio biologico. Il maneggio dei reagenti e lo smaltimento dei rifiuti devono rispettare tutte le normative locali e nazionali.
4. Questo prodotto è potenzialmente irritante per gli occhi, il sistema respiratorio e la pelle. Questo prodotto può anche essere nocivo se ingerito. Evitare l'esposizione cutanea, il contatto con gli occhi, l'inalazione e l'ingestione.
5. RoboSep™ è fornito come attrezzatura generale da laboratorio. È dovere dell'utente verificare che RoboSep™ soddisfi i propri requisiti specifici.
6. È dovere dell'utente verificare le prestazioni delle cellule isolate nelle analisi a valle.

Descrizione dei Componenti

NOME DEL COMPONENTE	NR. DEL COMPONENTE	QUANTITÀ	FORMATO
EasySep™ Direct HLA Crossmatch B Cell Isolation Cocktail	89684C	2 x 2,5 mL	Combinazione di anticorpi monoclonali in PBS.
EasySep™ Direct RapidSpheres™ 50302	50302	4 x 2,5 mL	Sospensione di particelle magnetiche e anticorpi monoclonali in PBS.

PBS - tampone fosfato salino

Si potrebbe osservare la formazione di un precipitato nel tubo del cocktail, questo non influenza la prestazione.



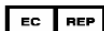
STEMCELL Technologies Inc | 1618 Station Street, Vancouver, BC | V6A 1B6 | Canada | www.stemcell.com

For Technical Assistance

Tel: +1.604.877.0713

European toll-free number: 00800 7836 2355

e-mail: techsupport@stemcell.com



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover • Germany



Document #DX21446
Version 1.0.0
2017

Pagina 1 di 8

Preparazione del Campione

Per una deplezione ottimale dei globuli rossi, prelevare il sangue usando come anticoagulante eparina o acido citrico-sodio citrato-destrosio (ACD).

Per una migliore raccolta, usare sangue intero umano non trattato. La raccolta delle cellule arricchite desiderate decresce nei campioni prelevati da oltre 24 ore.

Il volume di campione che è possibile trattare dipende dal magnete EasySep™ usato per la procedura di arricchimento. I campioni vanno collocati nell'apposita provetta in modo da entrare in modo corretto nel corrispondente magnete EasySep™ (vedere Tabelle 1 - 4).

STRATO LEUCOCITARIO

1. Aggiungere al sangue intero un pari volume del terreno raccomandato.
2. Centrifugare a 800 G per 10 minuti a temperatura ambiente (15 - 25°C) a freno disinnestato.
3. Rimuovere lo strato leucocitario concentrato, insieme a una piccola porzione del plasma e dei globuli rossi (RBC) concentrati. L'obiettivo è di concentrare i leucociti di circa 5 volte mantenendo lo stesso ematocrito.
4. Trasferire un massimo di 7 mL di strato leucocitario nell'apposita provetta (vedere Tabelle 1, 2 e 6).

MILZA o LINFONODO

Spezzettare la milza o il linfonodo in PBS o in soluzione salina bilanciata di Hanks (HBSS) contenente il 2% di siero fetale bovino (FBS). Rimuovere aggregati e detriti filtrando la sospensione cellulare attraverso un colino in nylon a maglie da 100 µm preumidificato. Risciacquare il colino con PBS o HBSS contenente il 2% di FBS. Centrifugare a 300 G per 10 minuti e risospendere a $1 - 100 \times 10^6$ cellule/mL nel terreno raccomandato.

Terreno Raccomandato

D-PBS (privo di Ca^{++} e Mg^{++} ; Nr. di catalogo 37350)

Materiali Necessari ma non Forniti

Magnete EasySep™ (Nr. di catalogo 18000), Magnete EasySep™ "The Big Easy" (Nr. di catalogo 18001), Magnete EasySep™ Easy 50 (Nr. di catalogo 18002), Magnete EasyEights™ EasySep™ (Nr. di catalogo 18103) o RoboSep™-S (Nr. di catalogo #21000).



Istruzioni per l'Uso – Protocolli EasySep™ Manuali

Vedere pagina 1 per Preparazione del campione e Terreno raccomandato. Consultare le Tabelle 1 - 4 per istruzioni dettagliate sulla procedura EasySep™ per ciascun magnete.

Tabella 1. Protocollo per il Kit d'Isolamento Linfociti B via Prova Incrociata HLA EasySep™ Direct per SANGUE INTERO o STRATO LINFOCITARIO

		MAGNETI EASYSEP™	
FASE	ISTRUZIONI	 EasySep™ (Nr. di catalogo 18000)	 "The Big Easy" (Nr. di catalogo 18001)
1	Prelevare un campione del volume desiderato.	0,5 - 1,5 mL	1 - 7 mL
	Versare il campione nell'apposita provetta.	Provetta a fondo arrotondato da 5 mL (12 x 75 mm) in polistirolo (p.es. Nr. di catalogo #38007)	Provetta a fondo arrotondato da 14 mL (17 x 95 mm) in polistirolo (p.es. Nr. di catalogo #38008)
2	Vortex RapidSpheres™. NOTA BENE: Le particelle devono apparire distribuite uniformemente.	30 secondi	30 secondi
3	Aggiungere al campione il cocktail d'isolamento.	50 µL/mL di campione	50 µL/mL di campione
4	Aggiungere al campione le RapidSpheres™.	50 µL/mL di campione	50 µL/mL di campione
	Mescolare e incubare.	A temperatura ambiente per 5 minuti	A temperatura ambiente per 5 minuti
5	Aggiungere il terreno raccomandato per portare il campione al volume indicato. Mescolare pipettando delicatamente su e giù 2 - 3 volte.	Portare a 2,5 mL	- Portare al doppio del volume per campioni ≤ 5 mL - Portare a 10 mL per campioni > 5 mL
	Collocare la provetta (senza tappo) nel magnete e incubare.	A temperatura ambiente per 5 minuti	A temperatura ambiente per 5 minuti
6	Afferrare il magnete e rovesciare magnete e provetta in un unico movimento, versando la sospensione di cellule arricchite* in una nuova provetta.	Usare una nuova provetta da 5 mL	Usare una nuova provetta da 14 mL
7	Aggiungere le RapidSpheres™ alla nuova provetta contenente le cellule arricchite.	Usare lo stesso volume della fase 4	Usare lo stesso volume della fase 4
	Mescolare e incubare.	A temperatura ambiente per 5 minuti	A temperatura ambiente per 5 minuti
8	Rimuovere la provetta dal magnete e collocare nel magnete la provetta dalla fase 7 (senza tappo) e incubare per una seconda separazione.	A temperatura ambiente per 5 minuti	A temperatura ambiente per 5 minuti
9	Afferrare il magnete e rovesciare magnete e provetta** in un unico movimento, versando la sospensione di cellule arricchite in una nuova provetta.	Le cellule isolate sono pronte per l'uso	Usare una nuova provetta da 14 mL
10	Rimuovere la provetta dal magnete e collocare nel magnete la provetta dalla fase 9 (senza tappo) e incubare per una terza separazione.	---	A temperatura ambiente per 5 minuti
11	Afferrare il magnete e rovesciare magnete e provetta** in un unico movimento, versando la sospensione di cellule arricchite in una nuova provetta.	---	Le cellule isolate sono pronte per l'uso

Temperatura ambiente - 15 - 25°C

* Dopo la prima separazione magnetica, le cellule raccolte possono contenere un quantitativo significativo di globuli rossi e avere aspetto simile al campione originario di sangue intero umano non trattato.

** Per minimizzare la contaminazione da globuli rossi nelle cellule isolate, versare il campione in uscita da un lato pulito della provetta (vale a dire il lato opposto a quello dove si era versato il campione in entrata).

Tabella 2. Protocollo per il Kit d'Isolamento Linfociti B via Prova Incrociata HLA EasySep™ Direct per SANGUE INTERO o STRATO LINFOCITARIO

		MAGNETI EASYSEP™		
FASE	ISTRUZIONI	EasyEights™ (Nr. di catalogo 18103)		Easy 50 (Nr. di catalogo 18002)
		Provetta da 5 mL	Provetta da 14 mL	
1	Prelevare un campione del volume desiderato.	0,5 - 1,5 mL	1 - 7 mL	7 - 30 mL
	Versare il campione nell'apposita provetta.	Provetta a fondo arrotondato da 5 mL (12 x 75 mm) in polistirolo (p.es. Nr. di catalogo #38007)	Provetta a fondo arrotondato da 14 mL (17 x 95 mm) in polistirolo (p.es. Nr. di catalogo #38008)	Provetta conica da 50 mL (p.es. Nr. di catalogo 38010)
2	Vortex RapidSpheres™. NOTA BENE: Le particelle devono apparire distribuite uniformemente.	30 secondi	30 secondi	30 secondi
3	Aggiungere al campione il cocktail d'isolamento.	50 µL/mL di campione	50 µL/mL di campione	50 µL/mL di campione
4	Aggiungere al campione le RapidSpheres™.	50 µL/mL di campione	50 µL/mL di campione	50 µL/mL di campione
	Mescolare e incubare.	A temperatura ambiente per 5 minuti	A temperatura ambiente per 5 minuti	A temperatura ambiente per 5 minuti
5	Aggiungere il terreno raccomandato per portare il campione al volume indicato. Mescolare pipettando delicatamente su e giù 2 - 3 volte.	Portare a 2,5 mL	- Portare al doppio del volume per campioni ≤ 5 mL - Portare a 10 mL per campioni > 5 mL	- Portare al doppio del volume per campioni ≤ 25 mL - Portare a 50 mL per campioni > 25 mL
	Collocare la provetta (senza tappo) nel magnete e incubare.	A temperatura ambiente per 5 minuti	A temperatura ambiente per 5 minuti	A temperatura ambiente per 10 minuti
6	Pipettare*** con cura (non versare) la sospensione di cellule arricchite in una nuova provetta. NOTA BENE: Raccogliere l'intera frazione limpida dalla sommità al fondo. Per una raccolta ottimale, raccogliere anche un piccolo volume di globuli rossi (fino al 10% del volume del campione iniziale).	Usare una nuova provetta da 5 mL	Usare una nuova provetta da 14 mL	Usare una nuova provetta da 50 mL
7	Aggiungere le RapidSpheres™ alla nuova provetta contenente le cellule arricchite.	Usare lo stesso volume della fase 4	Usare lo stesso volume della fase 4	Usare lo stesso volume della fase 4
	Mescolare e incubare.	A temperatura ambiente per 5 minuti	A temperatura ambiente per 5 minuti	A temperatura ambiente per 5 minuti
8	Rimuovere la provetta dal magnete e collocare nel magnete la provetta dalla fase 7 (senza tappo) e incubare per una seconda separazione.	A temperatura ambiente per 5 minuti	A temperatura ambiente per 5 minuti	A temperatura ambiente per 5 minuti
9	Pipettare*** con cura (non versare) la sospensione di cellule arricchite in una nuova provetta. NOTA BENE: Raccogliere solo la frazione limpida.	Usare una nuova provetta da 5 mL	Usare una nuova provetta da 14 mL	Usare una nuova provetta da 50 mL
10	Rimuovere la provetta dal magnete e collocare nel magnete la provetta dalla fase 9 (senza tappo) contenente le cellule arricchite e incubare per una terza separazione.	A temperatura ambiente per 5 minuti	A temperatura ambiente per 5 minuti	A temperatura ambiente per 5 minuti
11	Pipettare*** con cura (non versare) la sospensione di cellule arricchite in una nuova provetta. NOTA BENE: Raccogliere solo la frazione limpida.	Le cellule isolate sono pronte per l'uso	Le cellule isolate sono pronte per l'uso	Le cellule isolate sono pronte per l'uso

Temperatura ambiente - 15 - 25°C

*** Raccogliere tutto il surnatante, in una sola volta, in una sola pipetta (p.es. per la provetta EasyEights™ da 5 mL usare una pipetta sierologica da 2 mL [Nr. di catalogo 38002]; per la provetta EasyEights™ da 14 mL usare una pipetta sierologica da 10 mL [Nr. di catalogo 38004]).

Tabella 3. Protocollo per il Kit d'Isolamento Linfociti B via Prova Incrociata HLA EasySep™ Direct per MILZA o LINFONODO

		MAGNETI EASYSEP™	
FASE	ISTRUZIONI	 EasySep™ (Nr. di catalogo 18000)	"The Big Easy" (Nr. di catalogo 18001) 
1	Prelevare un campione del volume desiderato.	0,5 - 1,5 mL	1 - 7 mL
	Versare il campione nell'apposita provetta.	Provetta a fondo arrotondato da 5 mL (12 x 75 mm) in polistirolo (p.es. Nr. di catalogo #38007)	Provetta a fondo arrotondato da 14 mL (17 x 95 mm) in polistirolo (p.es. Nr. di catalogo #38008)
2	Aggiungere al campione il cocktail d'isolamento.	50 µL/mL di campione	50 µL/mL di campione
	Mescolare e incubare.	A temperatura ambiente per 5 minuti	A temperatura ambiente per 5 minuti
3	Vortex RapidSpheres™. NOTA BENE: Le particelle devono apparire distribuite uniformemente.	30 secondi	30 secondi
4	Aggiungere al campione le RapidSpheres™. Mescolare pipettando delicatamente su e giù 2 - 3 volte.	50 µL/mL di campione	50 µL/mL di campione
5	Aggiungere il terreno raccomandato per portare il campione al volume indicato.	Portare a 2,5 mL	• Portare al doppio del volume per campioni ≤ 5 mL • Portare a 10 mL per campioni > 5 mL
	Collocare la provetta (senza tappo) nel magnete e incubare.	A temperatura ambiente per 3 minuti	A temperatura ambiente per 3 minuti
6	Afferrare il magnete e rovesciare magnete e provetta in un unico movimento, versando la sospensione di cellule arricchite* in una nuova provetta.	Usare una nuova provetta da 5 mL	Usare una nuova provetta da 14 mL
7	Aggiungere le RapidSpheres™ alla nuova provetta contenente le cellule arricchite. Mescolare pipettando delicatamente su e giù 2 - 3 volte.	Usare lo stesso volume della fase 4	Usare lo stesso volume della fase 4
8	Rimuovere la provetta dal magnete e collocare nel magnete la provetta dalla fase 7 (senza tappo) e incubare per una seconda separazione.	A temperatura ambiente per 3 minuti	A temperatura ambiente per 3 minuti
9	Afferrare il magnete e rovesciare magnete e provetta in un unico movimento, versando la sospensione di cellule arricchite* in una nuova provetta.	Le cellule isolate sono pronte per l'uso	Le cellule isolate sono pronte per l'uso

Temperatura ambiente - 15 - 25°C

Tabella 4. Protocollo per il Kit d'Isolamento Linfociti B via Prova Incrociata HLA EasySep™ Direct per MILZA o LINFONODO

		MAGNETI EASYSEP™	
FASE	ISTRUZIONI	EasyEights™ (Nr. di catalogo 18103)	
		Provetta da 5 mL	Provetta da 14 mL
1	Prelevare un campione del volume desiderato.	0,5 - 1,5 mL	1 - 7 mL
	Versare il campione nell'apposita provetta.	Provetta a fondo arrotondato da 5 mL (12 x 75 mm) in polistirolo (p.es. Nr. di catalogo #38007)	Provetta a fondo arrotondato da 14 mL (17 x 95 mm) in polistirolo (p.es. Nr. di catalogo #38008)
2	Aggiungere al campione il cocktail d'isolamento.	50 µL/mL di campione	50 µL/mL di campione
	Mescolare e incubare.	A temperatura ambiente per 5 minuti	A temperatura ambiente per 5 minuti
3	Vortex RapidSpheres™. NOTA BENE: Le particelle devono apparire distribuite uniformemente.	30 secondi	30 secondi
4	Aggiungere al campione le RapidSpheres™. Mescolare pipettando delicatamente su e giù 2 - 3 volte.	50 µL/mL di campione	50 µL/mL di campione
5	Aggiungere il terreno raccomandato per portare il campione al volume indicato. Mescolare pipettando delicatamente su e giù 2 - 3 volte.	Portare a 2,5 mL	- Portare al doppio del volume per campioni ≤ 5 mL - Portare a 10 mL per campioni > 5 mL
	Collocare la provetta (senza tappo) nel magnete e incubare.	A temperatura ambiente per 3 minuti	A temperatura ambiente per 3 minuti
6	Pipettare*** con cura (non versare) la sospensione di cellule arricchite in una nuova provetta. NOTA BENE: Raccogliere l'intera frazione limpida dalla sommità al fondo. Per una raccolta ottimale, raccogliere anche un piccolo volume di globuli rossi (fino al 10% del volume del campione iniziale).	Usare una nuova provetta da 5 mL	Usare una nuova provetta da 14 mL
7	Aggiungere le RapidSpheres™ alla nuova provetta contenente le cellule arricchite. Mescolare pipettando delicatamente su e giù 2 - 3 volte.	Usare lo stesso volume della fase 4	Usare lo stesso volume della fase 4
8	Rimuovere la provetta dal magnete e collocare nel magnete la provetta dalla fase 7 (senza tappo) e incubare per una seconda separazione.	A temperatura ambiente per 3 minuti	A temperatura ambiente per 3 minuti
9	Pipettare*** con cura (non versare) la sospensione di cellule arricchite in una nuova provetta. NOTA BENE: Raccogliere solo la frazione limpida.	Usare una nuova provetta da 5 mL Per il linfonodo: Le cellule isolate sono pronte per l'uso	Usare una nuova provetta da 14 mL Per il linfonodo: Le cellule isolate sono pronte per l'uso
10	Rimuovere la provetta dal magnete e collocare nel magnete la provetta dalla fase 9 (senza tappo) contenente le cellule arricchite e incubare per una terza separazione.	Per la milza: A temperatura ambiente per 3 minuti	Per la milza: A temperatura ambiente per 3 minuti
11	Pipettare*** con cura (non versare) la sospensione di cellule arricchite in una nuova provetta. NOTA BENE: Raccogliere solo la frazione limpida.	Per la milza: Le cellule isolate sono pronte per l'uso	Per la milza: Le cellule isolate sono pronte per l'uso

Temperatura ambiente = 15 - 25°C

*** Raccogliere tutto il surnatante, in una sola volta, in una sola pipetta (p.es. per la provetta EasyEights™ da 5 mL usare una pipetta sierologica da 2 mL [Nr. di catalogo 38002]; per la provetta EasyEights™ da 14 mL usare una pipetta sierologica da 10 mL [Nr. di catalogo 38004]).

Istruzioni per l'Uso – Protocollo Completamente Automatizzato RoboSep™

Vedere pagina 1 per Preparazione del campione e Terreno raccomandato. Consultare le Tabelle 5 - 6 per istruzioni dettagliate sulla procedura EasySep™.

Tabella 5. Protocollo per il Kit d'Isolamento Linfociti B via Prova Incrociata HLA RoboSep™ Direct per SANGUE INTERO, MILZA o LINFONODO

FASE	ISTRUZIONI	RoboSep™ (Nr. di catalogo 20000 e 21000)	
1	Preparare il campione alla concentrazione di cellule indicata nel volume desiderato.	Per la milza o il linfonodo: 0.5 - 6 mL a 1 - 100 x 10 ⁶ cellule/mL	
	Versare il campione nell'apposita provetta.	Per il sangue: 0,5 - 6 mL	
2	Selezionare il protocollo.	Provetta a fondo arrotondato da 14 mL (17 x 95 mm) in polistirolo (p.es. Nr. di catalogo #38008)	
3	Vortex RapidSpheres™. NOTA BENE: Le particelle devono apparire distribuite uniformemente.	EasySep™ Direct HLA Crossmatch B Cell Isolation Kit – For WB, Spleen, LN	
4	Caricare il rotore.	30 secondi	
	Avviare il protocollo.	Seguire le istruzioni a schermo	
5	Scaricare il rotore una volta completata la corsa.	Premere il pulsante verde "Run"	
		Le cellule isolate sono pronte per l'uso	

Tabella 6. Protocollo per il Kit d'Isolamento Linfociti B via Prova Incrociata HLA RoboSep™ Direct per STRATO LINFOCITARIO

FASE	ISTRUZIONI	RoboSep™ (Nr. di catalogo 20000 e 21000)	
1	Preparare un campione del volume desiderato.	2 - 6 mL	
	Versare il campione nell'apposita provetta.	Provetta a fondo arrotondato da 14 mL (17 x 95 mm) in polistirolo (p.es. Nr. di catalogo #38008)	
2	Selezionare il protocollo.	EasySep™ Direct HLA Crossmatch B Cell Isolation Kit - For BC	
3	Vortex RapidSpheres™. NOTA BENE: Le particelle devono apparire distribuite uniformemente.	30 secondi	
4	Caricare il rotore.	Seguire le istruzioni a schermo	
	Avviare il protocollo.	Premere il pulsante verde "Run"	
5	Scaricare il rotore una volta completata la corsa.	Le cellule isolate sono pronte per l'uso	

Note e Suggerimenti

RIMOZIONE DI GLOBULI ROSSI RESIDUI NELLE CELLULE ISOLATE

Solitamente, dopo l'isolamento delle cellule non è necessaria ulteriore deplezione di globuli rossi. Qualora globuli rossi residui siano visibili nel pellet di cellule isolate dopo la centrifugazione al termine del protocollo, risospendere in una piccola quantità (0,2 - 2,5 mL) di terreno raccomandato o di terreno di coltura desiderato e collocare in un magnete EasySep™ di minori dimensioni per un'ulteriore separazione da 5 minuti. Raccogliere il surnatante; a questo punto le cellule isolate sono pronte per l'uso nelle applicazioni a valle. I globuli rossi residui possono anche essere lisi usando la soluzione di cloruro d'ammonio (Nr. di catalogo 07800).

VALUTAZIONE DELLA PUREZZA

Per la valutazione della purezza dei linfociti T tramite citometria a flusso, usare i seguenti cloni di anticorpi coniugati al fluorocromo:

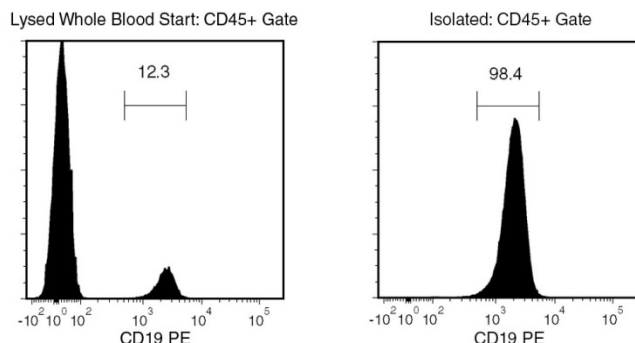
- Anti-Human CD19 Antibody, Clone HIB19 (Nr. di catalogo 60005), e
- Anti-Human CD45 Antibody, Clone HI30 (Nr. di catalogo 60018)

NOTA BENE: Si raccomanda di valutare la purezza sulle cellule positive al CD45 per escludere detriti, piastrine e globuli rossi.



Dati

Partendo da sangue intero umano da normali donatori sani, il contenuto tipico di linfociti B (CD19+) della frazione isolata finale non lisa è del 89 -99.8% (gating effettuato su CD45).



Nell'esempio riportato, il contenuto di linfociti B (CD19+) del campione iniziale di sangue intero liso e della frazione isolata finale non lisa è rispettivamente del 12,3% e del 98,4% (gating effettuato su CD45).

Assistenza Tecnica

Per ricevere assistenza tecnica, contattateci all'indirizzo techsupport@stemcell.com o chiamate +1.604.877.0713 oppure il numero verde europeo 00800 7836 2355. Per maggiori informazioni, visitate il sito www.stemcell.com.

Se necessitate di una copia stampata o di una versione di questo documento tradotta in una data lingua, contattate l'assistenza tecnica.

 Numero di catalogo o di riferimento	 Lotto	 Usare prima: AAAA-MM
 Attenzione, consultare i documenti allegati	 Dispositivo medico diagnostico in vitro	 Conservare entro il range di temperatura
 Consultare le istruzioni per l'uso	 Non riutilizzare	 Contiene materiale sufficiente per n test
 Marchio CE	 ID del produttore (nome e indirizzo)	 Rappresentante autorizzato EC dalla Comunità Europea

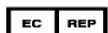
IL SISTEMA DI GESTIONE PER LA QUALITÀ DI STEMCELL TECHNOLOGIES INC. È CERTIFICATO ISO 13485. I PRODOTTI SONO DESTINATI ALL'USO DIAGNOSTICO IN VITRO PROFESSIONALE.

Copyright © 2017 di STEMCELL Technologies Inc. Tutti i diritti riservati, compresa grafica e immagini. STEMCELL Technologies & Design, STEMCELL Shield Design, Scientists Helping Scientists, EasyEights, EasySep, RapidSpheres e RoboSep sono marchi commerciali di STEMCELL Technologies Canada Inc. Tutti gli altri marchi commerciali sono di proprietà dei rispettivi detentori. Sebbene STEMCELL abbia compiuto ogni ragionevole sforzo per assicurarsi che le informazioni fornite da STEMCELL e dai suoi fornitori sono corrette, non si danno garanzie né assicurazioni in merito all'accuratezza o completezza di tali informazioni.



STEMCELL Technologies Inc | 1618 Station Street, Vancouver, BC | V6A 1B6 | Canada | www.stemcell.com

For Technical Assistance
Tel: +1.604.877.0713
European toll-free number: 00800 7836 2355
e-mail: techsupport@stemcell.com



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover • Germany



Document #DX21446
Version 1.0.0
2017

Pagina 8 di 8



EasySep™ Direct HLA Crossmatch B Cell Isolation Kit

Negative Selektion

Katalog-Nr. 89684

Für die Verarbeitung von 100 mL Vollblut



Scientists Helping Scientists™ | WWW.STEMCELL.COM

TOLL FREE PHONE 1 800 667 0322 • PHONE +1 604 877 0713

INFO@STEMCELL.COM • TECHSUPPORT@STEMCELL.COM

FOR GLOBAL CONTACT DETAILS VISIT OUR WEBSITE

Dokument Nr. DX21446 | Version 1_0_0

DEUTSCH

Verwendungszweck

Zur Isolierung von B-Zellen aus Proben von menschlichem Vollblut, Milz und Lymphknoten.

Produktbeschreibung

Dieses Kit dient der gezielten Entfernung von Nicht-B-Zellen durch immunomagnetische negative Selektion mit Antikörpern, die bestimmte Marker auf der Zelloberfläche erkennen. Unerwünschte Zellen werden mit Antikörpern und EasySep™ Direct RapidSpheres™ gekennzeichnet und mit Hilfe eines EasySep™ Magneten abgetrennt. Die erwünschten Zellen werden einfach in einem neuen Röhrchen gesammelt und stehen sofort für nachgelagerte in vitro diagnostische Anwendungen.

Qualitätskontrolle

EasySep™ Direct Produkte werden nach aseptischen Methoden und streng kontrollierten Prozessen hergestellt.

Jede Charge der EasySep™ Direct Cocktails und Partikel wird nach den Methoden der USP auf Sterilität geprüft und in Zellisolutions-Assays auf ihre Leistung getestet.

Aufbewahrung und Stabilität

Bei 2 - 8 °C aufbewahren. Dieses Produkt kann bei 15 - 25 °C transportiert werden, sollte jedoch nach der Ankunft gekühlt werden. Nicht einfrieren. Das Produkt ist stabil bei 2 - 8 °C bis zum Verfallsdatum (EXP) auf dem Etikett.

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

1. Nur zur Anwendung für die In-vitro-Diagnostik durch ausgebildete Laborkräfte bestimmt.
2. Nicht verwenden, falls ein Teil des Inhalts aus dem Fläschchen ausgetreten ist. Das ungebrauchte Produkt kann nach den Standard-Laborverfahren für ungefährliche Flüssigkeiten entsorgt werden.
3. Dieses Produkt sollte von ausgebildetem Personal, das die Grundsätze der guten Laborpraxis beachtet, gehandhabt werden. Nach dem Beimengen des Produkts zu menschlichen Zellen ist die Suspension als potenzielles biologisches Risiko zu behandeln. Beim Umgang mit Reagenzien und der Entsorgung von Abfall sollte sämtliche lokalen, staatlichen oder nationalen Vorschriften beachtet werden.
4. Dieses Produkt kann eine Reizwirkung auf die Augen, die Atmungsorgane und die Haut haben. Dieses Produkt kann bei Verschlucken ebenfalls gefährlich sein. Vermeiden Sie den Kontakt mit Haut und Augen sowie das Einatmen und die Ingestion des Produkts.
5. RoboSep™ wird als allgemeines Laborgerät zur Verfügung gestellt. Der Benutzer ist für die Validierung von RoboSep™ verantwortlich, damit es seine spezifischen Bedürfnisse erfüllt.
6. Der Benutzer ist für die Validierung der Leistung der isolierten Zellen in Folgeassays verantwortlich.

Komponentenbeschreibungen

KOMPONENTENNAME	KOMPONENTE NUMMER	MENGE	FORMAT
EasySep™ Direct HLA Crossmatch B Cell Isolation Cocktail	89684C	2 x 2,5 mL	Eine Kombination aus monoklonalen Antikörpern in PBS.
EasySep™ Direct RapidSpheres™ 50302	50302	4 x 2,5 mL	Eine Suspension aus magnetischen Partikeln und monoklonalen Antikörpern in PBS.

PBS - phosphatgepufferte Kochsalzlösung

Im Reaktionsgefäß kann ein Niederschlag beobachtet werden, der jedoch keinen Effekt auf die Effizienz hat.



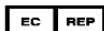
STEMCELL Technologies Inc | 1618 Station Street, Vancouver, BC | V6A 1B6 | Canada | www.stemcell.com

For Technical Assistance

Tel.: +1 604 877 0713

European toll-free number: 00800 7836 2355

e-Mail: techsupport@stemcell.com



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover • Germany



Document #DX21446
Version 1.0.0
2017

Probenvorbereitung

Für einen optimalen Abbau der roten Blutkörperchen verwenden Sie Heparin oder Acid-Citrate-Dextrose (ACD) als Antikoagulans für die Blutabnahme.

Verwenden Sie unverarbeitetes menschliches Vollblut für eine optimale Gewinnung. Die Gewinnung der erwünschten angereicherten Zellen nimmt bei Proben, die älter als 24 Stunden sind, ab.

Die Menge der zu verarbeitenden Probe hängt von dem EasySep™ Magneten ab, der für das Gewinnungsverfahren verwendet wird. Die Proben müssen in das vorgeschriebene Röhrchen gegeben werden, das in den entsprechenden EasySep™ Magneten passt (siehe Tabelle 1 - 4).

BUFFY-COAT

1. Geben Sie eine gleiche Menge des empfohlenen Mediums zu dem Vollblut hinzu.
2. Bei 800 x g für 10 Minuten bei Zimmertemperatur (15 - 25 °C) ohne Bremse zentrifugieren.
3. Entfernen Sie den konzentrierten Leukozytenfilm (dies ist der Buffy-Coat) plus eine kleine Menge Plasma und konzentrierte rote Blutkörperchen (RBCs). Das Ziel ist es, die Leukozyten etwa auf das Fünffache zu konzentrieren und dabei denselben Hämatokritwert zu erhalten.
4. Übertragen Sie maximal 7 mL des Buffy-Coats in das vorgeschriebene Röhrchen (siehe Tabelle 1, 2 und 6).

MILZ oder LYMPHKNOTEN

Milz oder Lymphknoten in PBS oder einer ausgeglichenen Salzlösung (Hanks' Balanced Salt Solution – HBSS), die 2 % fötales Kälberserum (FCS) enthält, aufschließen. Entfernen Sie Aggregate und Fremdkörper, indem Sie die Zellsuspension durch ein feuchtes Nylonsieb mit einer Maschenweite von 100 µm filtern. Spülen Sie das Sieb mit PBS oder HBSS, die 2 % FBS enthält. Bei 300 x g für 10 Minuten zentrifugieren und erneut in 1 - 100 x 10⁶ Zellen/ml im empfohlenen Medium auflösen.

Empfohlenes Medium

D-PBS (ohne Ca++ und Mg++; Katalog-Nr. 37350)

Benötigte, aber nicht mitgelieferte Materialien

EasySep™ Magnet (Katalog-Nr. 18000), „The Big Easy“ EasySep™ Magnet (Katalog-Nr. 18001), Easy 50 EasySep™ Magnet (Katalog-Nr. 18002), EasyEights™ EasySep™ Magnet (Katalog-Nr. 18103), oder RoboSep™-S (Katalog-Nr. 21000).



Gebrauchsanleitung – Manuelle EasySep™ Protokolle

Probenvorbereitung und empfohlenes Medium: siehe Seite 1. Genaue Anweisungen zum EasySep™ Verfahren für jeden Magneten sind in Tabelle 1 - 4 zu finden.

Tabelle 1. Protokoll für EasySep™ Direct HLA-Crossmatch B-Zellen-Isolierungskits für VOLLBLUT oder BUFFY-COAT

		EASYSEP™ MAGNETEN	
SCHRITT	ANLEITUNG	 EasySep™ (Katalog-Nr. 18000)	 “The Big Easy” (Katalog-Nr. 18001)
1	Probe innerhalb des Volumenbereichs entnehmen.	0,5 - 1,5 mL	1 - 7 mL
	Probe in das vorgeschriebene Röhrchen geben.	5 mL (12 x 75 mm) Rundboden-Röhrchen aus Polystyrol (z. B. Katalog-Nr. 38007)	14 mL (17 x 95 mm) Rundboden-Röhrchen aus Polystyrol (z. B. Katalog-Nr. 38008)
2	Vortex RapidSpheres™. HINWEIS: Die Teilchen sollten gleichmäßig verteilt erscheinen.	30 Sekunden	30 Sekunden
3	Isolierungs-Cocktail zur Probe hinzugeben.	50 µL/mL Probe	50 µL/mL Probe
4	RapidSpheres™ zur Probe hinzugeben.	50 µL/mL Probe	50 µL/mL Probe
	Mischen und inkubieren.	5 Minuten bei RT stehen lassen	5 Minuten bei RT stehen lassen
5	Empfohlenes Medium hinzugeben, um die Probe bis zum angegebenen Volumen aufzufüllen. Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren (2 bis 3 Mal) vermischen.	Auf 2,5 mL auffüllen	- Bei Proben ≤ 5 mL auf das doppelte Volumen auffüllen - Bei Proben > 5 mL auf 10 mL auffüllen
	Das Röhrchen (ohne Verschluss) in den Magneten geben und inkubieren.	5 Minuten bei RT stehen lassen	5 Minuten bei RT stehen lassen
6	Den Magneten aufnehmen und in einer fließenden Bewegung den Magneten und das Röhrchen invertieren und die angereicherte Zellsuspension* in ein neues Röhrchen gießen.	Ein neues 5 mL-Röhrchen verwenden	Ein neues 14 mL-Röhrchen verwenden
7	RapidSpheres™ in das neue Röhrchen mit den angereicherten Zellen geben.	Dasselbe Volumen verwenden wie in Schritt 4	Dasselbe Volumen verwenden wie in Schritt 4
	Mischen und inkubieren.	5 Minuten bei RT stehen lassen	5 Minuten bei RT stehen lassen
8	Das Röhrchen aus dem Magneten entfernen und das Röhrchen aus Schritt 7 (ohne Verschluss) in den Magneten geben und für eine zweite Trennung inkubieren.	5 Minuten bei RT stehen lassen	5 Minuten bei RT stehen lassen
9	Den Magneten aufnehmen und in einer fließenden Bewegung den Magneten und das Röhrchen** invertieren und die angereicherte Zellsuspension in ein neues Röhrchen gießen.	Die isolierten Zellen sind gebrauchsfertig	Ein neues 14 mL-Röhrchen verwenden
10	Das Röhrchen aus dem Magneten entfernen und das neue Röhrchen aus Schritt 9 (ohne Verschluss) in den Magneten geben und für eine dritte Trennung inkubieren.	---	5 Minuten bei RT stehen lassen
11	Den Magneten aufnehmen und in einer fließenden Bewegung den Magneten und das Röhrchen** invertieren und die angereicherte Zellsuspension in ein neues Röhrchen gießen.	---	Die isolierten Zellen sind gebrauchsfertig

RT - Raumtemperatur (15 - 25 °C)

* Nach der ersten magnetischen Trennung können die gewonnenen Zellen eine erhebliche Menge roter Blutkörperchen enthalten und ähnlich wie die ursprüngliche, unverarbeitete Probe menschlichen Vollbluts aussehen.

** Um die Kontaminierung der isolierten Zellen durch rote Blutkörperchen zu minimieren, gießen Sie die Probe entlang eines sauberen Bereichs des Röhrchens ab (d.h. an der dem Eingießbereich gegenüberliegenden Seite).

Tabelle 2. Protokoll für EasySep™ Direct HLA-Crossmatch B-Zellen-Isolierungskit für VOLLBLUT oder BUFFY-COAT

		EASYSEP™ MAGNETEN		
SCHRITT	ANLEITUNG	EasyEights™ (Katalog-Nr. 18103)		Easy 50 (Katalog Nr.18002)
		5 mL Rörchen	14 mL Rörchen	
1	Probe innerhalb des Volumenbereichs entnehmen.	0,5 - 1,5 mL	1 - 7 mL	7 - 30 mL
	Probe in das vorgeschriebene Rörchen geben.	5 mL (12 x 75 mm) Rundboden-Rörchen aus Polystyrol (z. B. Katalog-Nr. 38007)	14 mL (17 x 95 mm) Rundboden-Rörchen aus Polystyrol (z. B. Katalog-Nr. 38008)	50 mL konisches Rörchen (z. B. Katalog-Nr. 38010)
2	Vortex RapidSpheres™. HINWEIS: Die Teilchen sollten gleichmäßig verteilt erscheinen.	30 Sekunden	30 Sekunden	30 Sekunden
3	Isolierungs-Cocktail zur Probe hinzugeben.	50 µL/mL Probe	50 µL/mL Probe	50 µL/mL Probe
4	RapidSpheres™ zur Probe hinzugeben.	50 µL/mL Probe	50 µL/mL Probe	50 µL/mL Probe
	Mischen und inkubieren.	5 Minuten bei RT stehen lassen	5 Minuten bei RT stehen lassen	5 Minuten bei RT stehen lassen
5	Empfohlenes Medium hinzugeben, um die Probe bis zum angegebenen Volumen aufzufüllen. Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren (2 bis 3 Mal) vermischen.	Auf 2,5 mL auffüllen	- Bei Proben ≤ 5 mL auf das doppelte Volumen auffüllen - Bei Proben > 5 mL auf 10 mL auffüllen	- Bei Proben ≤ 25 mL auf das doppelte Volumen auffüllen - Bei Proben > 25 mL auf 50 mL auffüllen
	Das Rörchen (ohne Verschluss) in den Magneten geben und inkubieren.	5 Minuten bei RT stehen lassen	5 Minuten bei RT stehen lassen	10 Minuten bei RT stehen lassen
6	Die angereicherte Zellsuspension vorsichtig in ein neues Rörchen pipettieren*** (nicht gießen). HINWEIS: Den gesamten transparenten Anteil von oben bis unten entnehmen. Für eine optimale Gewinnung sollte auch ein geringes Volumen an roten Blutkörperchen entnommen werden (bis zu 10 % des Ausgangsvolumens der Probe).	Ein neues 5 mL-Rörchen verwenden	Ein neues 14 mL-Rörchen verwenden	Ein neues 50 mL-Rörchen verwenden
7	RapidSpheres™ in das neue Rörchen mit den angereicherten Zellen geben.	Dasselbe Volumen verwenden wie in Schritt 4	Dasselbe Volumen verwenden wie in Schritt 4	Dasselbe Volumen verwenden wie in Schritt 4
	Mischen und inkubieren.	5 Minuten bei RT stehen lassen	5 Minuten bei RT stehen lassen	5 Minuten bei RT stehen lassen
8	Das Rörchen aus dem Magneten entfernen und das Rörchen aus Schritt 7 (ohne Verschluss) in den Magneten geben und für eine zweite Trennung inkubieren.	5 Minuten bei RT stehen lassen	5 Minuten bei RT stehen lassen	5 Minuten bei RT stehen lassen
9	Die angereicherte Zellsuspension vorsichtig in ein neues Rörchen pipettieren*** (nicht gießen). HINWEIS: Nur den transparenten Anteil entnehmen.	Ein neues 5 mL-Rörchen verwenden	Ein neues 14 mL-Rörchen verwenden	Ein neues 50 mL-Rörchen verwenden
10	Das Rörchen aus dem Magneten entfernen und das neue Rörchen aus Schritt 9 (ohne Verschluss) mit den angereicherten Zellen in den Magneten geben und für eine dritte Trennung inkubieren.	5 Minuten bei RT stehen lassen	5 Minuten bei RT stehen lassen	5 Minuten bei RT stehen lassen
11	Die angereicherte Zellsuspension vorsichtig in ein neues Rörchen pipettieren*** (nicht gießen). HINWEIS: Nur den transparenten Anteil entnehmen.	Die isolierten Zellen sind gebrauchsfertig	Die isolierten Zellen sind gebrauchsfertig	Die isolierten Zellen sind gebrauchsfertig

RT - Raumtemperatur (15 - 25 °C)

*** Nehmen Sie den gesamten Überstand auf einmal in eine einzige Pipette auf (benutzen Sie z. B. eine 2 mL serologische Pipette [Katalog-Nr. 38002] für das EasyEights™ 5 mL Rörchen; für das EasyEights™ 14 mL Rörchen empfiehlt sich eine 10 mL serologische Pipette [Katalog-Nr. 38004]).

Tabelle 3. Protokoll für EasySep™ Direct HLA-Crossmatch B-Zellen-Isolierungskits für MILZ oder LYMPHKNOTEN

		EASYSEP™ MAGNETEN	
SCHRITT	ANLEITUNG	 EasySep™ (Katalog-Nr. 18000)	 “The Big Easy” (Katalog-Nr. 18001)
1	Probe innerhalb des Volumenbereichs entnehmen.	0,5 - 1,5 mL	1 - 7 mL
	Probe in das vorgeschriebene Röhrchen geben.	5 mL (12 x 75 mm) Rundboden-Röhrchen aus Polystyrol (z. B. Katalog-Nr. 38007)	14 mL (17 x 95 mm) Rundboden-Röhrchen aus Polystyrol (z. B. Katalog-Nr. 38008)
2	Isolierungs-Cocktail zur Probe hinzugeben.	50 µL/mL Probe	50 µL/mL Probe
	Mischen und inkubieren.	5 Minuten bei RT stehen lassen	5 Minuten bei RT stehen lassen
3	Vortex RapidSpheres™. HINWEIS: Die Teilchen sollten gleichmäßig verteilt erscheinen.	30 Sekunden	30 Sekunden
4	RapidSpheres™ zur Probe hinzugeben. Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren (2 bis 3 Mal) vermischen.	50 µL/mL Probe	50 µL/mL Probe
5	Empfohlenes Medium hinzugeben, um die Probe bis zum angegebenen Volumen aufzufüllen.	Auf 2,5 mL auffüllen	• Bei Proben ≤ 5 mL auf das doppelte Volumen auffüllen • Bei Proben > 5 mL auf 10 mL auffüllen
	Das Röhrchen (ohne Verschluss) in den Magneten geben und inkubieren.	3 Minuten bei RT stehen lassen	3 Minuten bei RT stehen lassen
6	Den Magneten aufnehmen und in einer fließenden Bewegung den Magneten und das Röhrchen umdrehen und die angereicherte Zellsuspension in ein neues Röhrchen gießen.	Ein neues 5 mL-Röhrchen verwenden	Ein neues 14 mL-Röhrchen verwenden
7	RapidSpheres™ in das neue Röhrchen mit den angereicherten Zellen geben. Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren (2 bis 3 Mal) vermischen.	Dasselbe Volumen verwenden wie in Schritt 4	Dasselbe Volumen verwenden wie in Schritt 4
8	Das Röhrchen aus dem Magneten entfernen und das Röhrchen aus Schritt 7 (ohne Verschluss) in den Magneten geben und für eine zweite Trennung inkubieren.	3 Minuten bei RT stehen lassen	3 Minuten bei RT stehen lassen
9	Den Magneten aufnehmen und in einer fließenden Bewegung den Magneten und das Röhrchen umdrehen und die angereicherte Zellsuspension in ein neues Röhrchen gießen.	Die isolierten Zellen sind gebrauchsfertig	Die isolierten Zellen sind gebrauchsfertig

RT - Raumtemperatur (15 - 25 °C)

Tabelle 4. Protokoll für EasySep™ Direct HLA-Crossmatch B-Zellen-Isolierungskit für MILZ oder LYMPHKNOTEN

		EASYSEP™ MAGNETEN	
SCHRITT	ANLEITUNG	EasyEights™ (Katalog-Nr. 18103)	
		 5 mL Röhrchen	 14 mL Röhrchen
1	Probe innerhalb des Volumenbereichs entnehmen.	0,5 - 1,5 mL	1 - 7 mL
	Probe in das vorgeschriebene Röhrchen geben.	5 mL (12 x 75 mm) Rundboden-Röhrchen aus Polystyrol (z. B. Katalog-Nr. 38007)	14 mL (17 x 95 mm) Rundboden-Röhrchen aus Polystyrol (z. B. Katalog-Nr. 38008)
2	Isolierungs-Cocktail zur Probe hinzugeben.	50 µL/mL Probe	50 µL/mL Probe
	Mischen und inkubieren.	5 Minuten bei RT stehen lassen	5 Minuten bei RT stehen lassen
3	Vortex RapidSpheres™. HINWEIS: Die Teilchen sollten gleichmäßig verteilt erscheinen.	30 Sekunden	30 Sekunden
4	RapidSpheres™ zur Probe hinzugeben. Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren (2 bis 3 Mal) vermischen.	50 µL/mL Probe	50 µL/mL Probe
5	Empfohlenes Medium hinzugeben, um die Probe bis zum angegebenen Volumen aufzufüllen. Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren (2 bis 3 Mal) vermischen.	Auf 2,5 mL auffüllen	- Bei Proben ≤ 5 mL auf das doppelte Volumen auffüllen - Bei Proben > 5 mL auf 10 mL auffüllen
	Das Röhrchen (ohne Verschluss) in den Magneten geben und inkubieren.	3 Minuten bei RT stehen lassen	3 Minuten bei RT stehen lassen
6	Die angereicherte Zellsuspension vorsichtig in ein neues Röhrchen pipettieren*** (nicht gießen). HINWEIS: Den gesamten transparenten Anteil von oben bis unten entnehmen. Für eine optimale Gewinnung sollte auch ein geringes Volumen an roten Blutkörperchen entnommen werden, falls vorhanden (bis zu 10 % des Ausgangsvolumens der Probe).	Ein neues 5 mL-Röhrchen verwenden	Ein neues 14 mL-Röhrchen verwenden
7	RapidSpheres™ in das neue Röhrchen mit den angereicherten Zellen geben. Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren (2 bis 3 Mal) vermischen.	Dasselbe Volumen verwenden wie in Schritt 4	Dasselbe Volumen verwenden wie in Schritt 4
8	Das Röhrchen aus dem Magneten entfernen und das Röhrchen aus Schritt 7 (ohne Verschluss) in den Magneten geben und für eine zweite Trennung inkubieren.	3 Minuten bei RT stehen lassen	3 Minuten bei RT stehen lassen
9	Die angereicherte Zellsuspension vorsichtig in ein neues Röhrchen pipettieren*** (nicht gießen). HINWEIS: Nur den transparenten Anteil entnehmen.	Ein neues 5 mL-Röhrchen verwenden Für Lymphknoten: Die isolierten Zellen sind gebrauchsfertig	Ein neues 14 mL-Röhrchen verwenden Für Lymphknoten: Die isolierten Zellen sind gebrauchsfertig
10	Das Röhrchen aus dem Magneten entfernen und das neue Röhrchen aus Schritt 9 (ohne Verschluss) mit den angereicherten Zellen in den Magneten geben und für eine dritte Trennung inkubieren.	Für Milz: 3 Minuten bei RT stehen lassen	Für Milz: 3 Minuten bei RT stehen lassen
11	Die angereicherte Zellsuspension vorsichtig in ein neues Röhrchen pipettieren*** (nicht gießen). HINWEIS: Nur den transparenten Anteil entnehmen.	Für Milz: Die isolierten Zellen sind gebrauchsfertig	Für Milz: Die isolierten Zellen sind gebrauchsfertig

RT - Raumtemperatur (15 - 25 °C)

*** Nehmen Sie den gesamten Überstand auf einmal in eine einzige Pipette auf (benutzen Sie z. B. eine 2 mL serologische Pipette [Katalog-Nr. 38002] für das EasyEights™ 5 mL Röhrchen; für das EasyEights™ 14 mL Röhrchen empfiehlt sich eine 10 mL serologische Pipette [Katalog-Nr. 38004]).

Gebrauchsanleitung – Protokoll für den voll automatisierten RoboSep™

Probenvorbereitung und empfohlenes Medium: siehe Seite 1. Genaue Anweisungen zum RoboSep™ Verfahren sind in Tabelle 5 und 6 zu finden.

Tabelle 5. Protokoll für RoboSep™ Direct HLA-Crossmatch B-Zellen-Isolierungskit für VOLLBLUT, MILZ oder LYMPHKNOTEN

SCHRITT	ANLEITUNG	RoboSep™ (Katalog-Nr. 20000 und 21000)	
1	Probe mit der angegebenen Zellkonzentration innerhalb des Volumenbereichs vorbereiten.	Für Milz oder Lymphknoten: 0,5 - 6 mL bei 1 - 100 x 10 ⁶ Zellen/mL Für Blut: 0,5 - 6 mL	
	Probe in das vorgeschriebene Röhrchen geben.	14 mL (17 x 95 mm) Rundboden-Röhrchen aus Polystyrol (z. B. Katalog-Nr. 38008)	
2	Protokoll wählen.	EasySep™ Direct HLA Crossmatch B Cell Isolation Kit – For WB, Spleen, LN	
3	Vortex RapidSpheres™. HINWEIS: Die Teilchen sollten gleichmäßig verteilt erscheinen.	30 Sekunden	
4	Karussell beladen.	Aufforderungen auf dem Bildschirm befolgen	
	Protokoll starten.	Die grüne „Run“-Taste drücken	
5	Karussell nach beendetem Durchlauf entladen.	Die isolierten Zellen sind gebrauchsfertig	

Tabelle 6. Protokoll für RoboSep™ Direct HLA-Crossmatch B-Zellen-Isolierungskit für BUFFY-COAT

SCHRITT	ANLEITUNG	RoboSep™ (Katalog-Nr. 20000 und 21000)	
1	Probe innerhalb des Volumenbereichs vorbereiten.	2 - 6 mL	
	Probe in das vorgeschriebene Röhrchen geben.	14 mL (17 x 95 mm) Rundboden-Röhrchen aus Polystyrol (z. B. Katalog-Nr. 38008)	
2	Protokoll wählen.	EasySep™ Direct HLA Crossmatch B Cell Isolation Kit – For BC	
3	Vortex RapidSpheres™. HINWEIS: Die Teilchen sollten gleichmäßig verteilt erscheinen.	30 Sekunden	
4	Karussell beladen.	Aufforderungen auf dem Bildschirm befolgen	
	Protokoll starten.	Die grüne „Run“-Taste drücken	
5	Karussell nach beendetem Durchlauf entladen.	Die isolierten Zellen sind gebrauchsfertig	

Hinweise und Tipps

ENTFERNEN DER VERBLEIBENDEN ROTEN BLUTKÖRPERCHEN IN DEN ISOLIERTEN ZELLEN

Normalerweise ist nach der Zellisolierung kein weiterer Abbau der roten Blutkörperchen notwendig. Sollten nach der Zentrifugierung nach dem Ende des Protokolls noch restliche rote Blutkörperchen im isolierten Zellpellet sichtbar sein, resuspendieren Sie dieses in einem geringen Volumen (0,2 - 2,5 mL) des empfohlenen Mediums oder eines erwünschten Nährmediums auf und geben Sie es für eine zusätzliche 5-minütige Trennung in einen kleineren EasySep™ Magneten. Nehmen Sie den Überstand auf. Die isolierten Zellen sind nun gebrauchsfertig für Folgeanwendungen. Verbleibende rote Blutkörperchen können auch in einer Ammoniumchloridlösung lysiert werden (Katalog-Nr. 07800).

REINHEITSANALYSE

Benutzen Sie die folgenden fluorchrom-konjugierten Antikörperklone für die Reinheitsanalyse der B-Zellen durch Durchflusszytometrie:

- Anti-Human CD19 Antibody, Clone HIB19 (Katalog-Nr. 60005), und
- Anti-Human CD45 Antibody, Clone HI30 (Katalog-Nr. 60018)

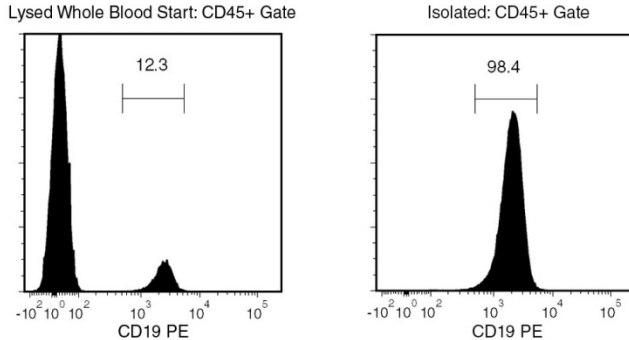
HINWEIS: Es wird empfohlen, die Reinheitsanalyse an den CD45-positiven Zellen durchzuführen, um Kontaminationen, Blutplättchen und rote Blutkörperchen auszuschließen.



STEMCELL Technologies Inc | 1618 Station Street, Vancouver, BC | V6A 1B6 | Canada | www.stemcell.com

Daten

Ausgehend von menschlichem Vollblut von normalen, gesunden Spendern beträgt der typische B-Zellen-Gehalt (CD19+) des unlysierten isolierten Endanteils 89 - 99.8% (gated auf CD45).



Im Beispiel oben beträgt der B-Zellen-Gehalt (CD19+) der lysierten Vollblut-Ausgangssprobe und des unlysierten isolierten Endanteils jeweils 12,3% und 98,4% (gated auf CD45).

Technische Unterstützung

Falls Sie technische Unterstützung benötigen, kontaktieren Sie uns unter der E-Mail-Adresse techsupport@stemcell.com oder telefonisch unter der Nummer +1 604 877 0713 oder der gebührenfreien Nummer in Europa: 00800 7836 2355. Nähere Informationen erhalten Sie auf www.stemcell.com.

Falls Sie ein gedrucktes Exemplar oder eine übersetzte Version dieses Dokuments in einer bestimmten Sprache benötigen, wenden Sie sich bitte an den technischen Kundendienst.

REF Katalog oder Referenznummer	LOT Lotnummer	 Verbrauch bis: JJJJ-MM
 Vorsicht, beiliegende Dokumentation beachten	IVD In Vitro Diagnostisches Medizinprodukt	 Für Lagerung innerhalb der Temperaturgrenzen
 Gebrauchsanleitung lesen	 Nicht wiederverwenden	 Enthält genug für n- Tests
 CE Zeichen	 Hersteller Identifikation (Name & Adresse)	EC REP Autorisierter EG-Vertreter in der Europäischen Gemeinschaft

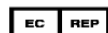
DAS QUALITÄTSMANAGEMENTSYSTEM VON STEMCELL TECHNOLOGIES INC. IST NACH ISO 13485 ZERTIFIZIERT. DIE PRODUKTE SIND ZUR ANWENDUNG FÜR DIE IN-VITRO-DIAGNOSTIK DURCH AUSGEBILDETE LABORKRÄFTE BESTIMMT.

Copyright © 2017 by STEMCELL Technologies Inc. Alle Rechte vorbehalten, einschließlich Grafiken und Abbildungen. STEMCELL Technologies & Design, STEMCELL Shield Design, Scientists Helping Scientists, EasyEights, EasySep, RapidSpheres und RoboSep sind eingetragene Handelsmarken der STEMCELL Technologies Canada Inc. Alle anderen Handelsmarken sind das Eigentum ihrer jeweiligen Inhaber. STEMCELL hat sich zwar angemessen bemüht sicherzustellen, dass die von STEMCELL und deren Zulieferern zur Verfügung gestellten Informationen zutreffend sind, leistet jedoch keine Garantien oder Zusicherungen hinsichtlich der Richtigkeit oder Vollständigkeit dieser Informationen.



STEMCELL Technologies Inc | 1618 Station Street, Vancouver, BC | V6A 1B6 | Canada | www.stemcell.com

For Technical Assistance
Tel.: +1 604 877 0713
European toll-free number: 00800 7836 2355
e-Mail: techsupport@stemcell.com



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover • Germany



Document #DX21446
Version 1.0.0
2017