

EasySep™ Human Whole Blood and Bone Marrow CD138 Positive Selection Kit II



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

For processing 60 mL whole blood or bone marrow

Catalog #17887

Positive Selection

Document #10000011550 | Version 00

ENGLISH

Description

Isolate highly purified CD138+ (syndecan-1) cells from fresh bone marrow or whole blood by immunomagnetic positive selection.

- Fast and easy-to-use
- No columns required

This kit targets CD138+ cells for positive selection with an antibody recognizing the CD138 surface marker. Desired cells are labeled with antibodies and magnetic particles, and separated without columns using an EasySep™ magnet. Unwanted cells are simply poured off, while desired cells remain in the tube. Isolated cells are immediately available for downstream applications such as fluorescence in situ hybridization (FISH), flow cytometry, culture, or DNA/RNA extraction.

Component Descriptions

COMPONENT NAME	COMPONENT #	QUANTITY	STORAGE	SHELF LIFE	FORMAT
EasySep™ Human Whole Blood and Bone Marrow CD138 Positive Selection Kit II Cocktail	17887C	3 x 1 mL	Store at 2 - 8°C. Do not freeze.	Stable until expiry date (EXP) on label.	A combination of monoclonal antibodies in PBS with 0.09% rHA. Includes an Fc receptor blocking antibody.
EasySep™ Dextran RapidSpheres™ 50100	50100	3 x 1 mL	Store at 2 - 8°C. Do not freeze.	Stable until expiry date (EXP) on label.	A suspension of magnetic particles in water.
EasySep™ Red Blood Cell Lysis Buffer, 10X Concentrate	20110	1 x 10 mL	Store at 15 - 25°C.	Stable until expiry date (EXP) on label.	A 10X concentrated red blood cell lysis reagent.

PBS - phosphate-buffered saline; rHA - recombinant human albumin

Components may be shipped at room temperature (15 - 25°C) but should be stored as indicated above.

Additional Reagent Stability Information

REAGENT NAME	STORAGE	SHELF LIFE
EasySep™ Red Blood Cell Lysis Buffer (1X dilution)	Store at 2 - 8°C. Do not freeze.	Stable for up to 3 months. Do not exceed the expiry date (EXP) of the original component.

Sample Preparation

For available fresh and frozen samples, see www.stemcell.com/primarycells.

PERIPHERAL BLOOD

Collect whole blood in a blood collection tube containing anticoagulant.

BONE MARROW

To avoid sample degradation and loss of CD138 from the fragile plasma cells, the samples should be processed as soon as possible and within 72 hours after collection.

1. Dilute the sample 5- to 10-fold in D-PBS (Without Ca⁺⁺ and Mg⁺⁺; Catalog #37350) and mix gently by pipetting up and down.
2. OPTIONAL (recommended): Pre-wet a 70 µm strainer with D-PBS. Filter the sample through the pre-wetted strainer to remove bone fragments, cell aggregates, and debris. Rinse the strainer with D-PBS.
3. Centrifuge cells at 300 x g for 10 minutes with the brake off.
4. Using a pipette, carefully remove and discard the plasma, without disturbing the cell pellet. Do not pour.

OPTIONAL: For bone marrow samples > 24 hours old, add DNase I Solution (1 mg/mL; Catalog #07900) at 100 µg/mL of the original sample volume to help reduce cell clumping. DNase I Solution can be added directly to the pelleted cells with gentle mixing. Incubate at room temperature (15 - 25°C) for 15 - 30 minutes prior to beginning the EasySep™ protocol.

NOTE: Avoid repeated freeze-thaw cycles of DNase I Solution.

5. Resuspend the cell pellet with EasySep™ Buffer:
 - If the sample has low cellularity, or if the sample volume is ≥ 2.5 mL, resuspend to the original sample volume.
 - If the sample volume is < 2.5 mL and has high cellularity or cellularity is unknown, resuspend to twice the original sample volume.


Recommended Medium

EasySep™ Buffer (Catalog #20144), RoboSep™ Buffer (Catalog #20104), or PBS containing 2% fetal bovine serum (FBS) and 1 mM EDTA. Medium should be free of Ca⁺⁺ and Mg⁺⁺.

Directions for Use – Manual EasySep™ Protocols

See pages 1 and 2 for Sample Preparation and Recommended Medium. Refer to Tables 1 and 2 for detailed instructions regarding the EasySep™ procedure.


Table 1. EasySep™ Human Whole Blood and Bone Marrow CD138 Positive Selection Kit II Protocol

		EASYSEP™ MAGNET
STEP	INSTRUCTIONS	“The Big Easy” EasySep™ Magnet (Catalog #18001) 
1	Prepare sample within the volume range.	0.5 - 4.5 mL
	Add sample to required tube.	14 mL (17 x 95 mm) polystyrene round-bottom tube (e.g. Catalog #38008)
2	Add 1X EasySep™ RBC Lysis Buffer to sample.	Equal volume to sample
3	Add Selection Cocktail to sample. NOTE: Do not vortex cocktail.	25 μ L/mL of diluted sample
	Mix and incubate.	RT for 3 minutes
4	Vortex RapidSpheres™. NOTE: Particles should appear evenly dispersed.	30 seconds
5	Add RapidSpheres™ to sample.	25 μ L/mL of diluted sample
	Mix and incubate.	RT for 3 minutes
6	Add recommended medium to top up the sample to the indicated volume. Mix by gently pipetting up and down 2 - 3 times.	<ul style="list-style-type: none"> • Top up to 5 mL for diluted samples < 2.5 mL • Top up to 10 mL for diluted samples ≥ 2.5 mL
	Place the tube (without lid) into the magnet and incubate.	RT for 10 minutes
7	Pick up the magnet, and in one continuous motion invert the magnet and tube,* pouring off the supernatant. Remove the tube from the magnet; this tube contains the isolated cells.	Discard supernatant
8	Add recommended medium to top up the sample to the indicated volume. Mix by gently pipetting up and down 2 - 3 times.	<ul style="list-style-type: none"> • Top up to 5 mL for diluted samples < 2.5 mL • Top up to 10 mL for diluted samples ≥ 2.5 mL
	Place the tube (without lid) into the magnet and incubate.	RT for 3 minutes
9	Pick up the magnet, and in one continuous motion invert the magnet and tube,* pouring off the supernatant. Remove the tube from the magnet; this tube contains the isolated cells.	Discard supernatant
10	Repeat steps as indicated.	Steps 8 and 9 (total of 1 x 10-minute and 2 x 3-minute separations)
11	Resuspend cells in desired medium. Be sure to collect cells from the sides of the tube.	Isolated cells are ready for use

RT - room temperature (15 - 25°C)

* Leave the magnet and tube inverted for 2 - 3 seconds, then return upright. Do not shake or blot off any drops that may remain hanging from the mouth of the tube.

Table 2. EasySep™ Human Whole Blood and Bone Marrow CD138 Positive Selection Kit II Protocol

		EASYSEP™ MAGNET
		 EasyEights™ (Catalog #18103) 14 mL tube
1	Prepare sample within the volume range.	0.5 - 4.5 mL
	Add sample to required tube.	14 mL (17 x 95 mm) polystyrene round-bottom tube (e.g. Catalog #38008)
2	Add 1X EasySep™ RBC Lysis Buffer to sample.	Equal volume to sample
3	Add Selection Cocktail to sample. NOTE: Do not vortex cocktail.	25 µL/mL of diluted sample
	Mix and incubate.	RT for 3 minutes
4	Vortex RapidSpheres™. NOTE: Particles should appear evenly dispersed.	30 seconds
5	Add RapidSpheres™ to sample.	25 µL/mL of diluted sample
	Mix and incubate.	RT for 3 minutes
6	Add recommended medium to top up sample to the indicated volume. Mix by gently pipetting up and down 2 - 3 times.	<ul style="list-style-type: none"> • Top up to 5 mL for diluted samples < 2.5 mL • Top up to 10 mL for diluted samples ≥ 2.5 mL
	Place the tube (without lid) into the magnet and incubate.	RT for 10 minutes
7	Carefully pipette** (do not pour) off the supernatant. Remove the tube from the magnet; this tube contains the isolated cells.	Discard supernatant
8	Add recommended medium to top up the sample to the indicated volume. Mix by gently pipetting up and down 2 - 3 times.	<ul style="list-style-type: none"> • Top up to 5 mL for diluted samples < 2.5 mL • Top up to 10 mL for diluted samples ≥ 2.5 mL
	Place the tube (without lid) into the magnet and incubate.	RT for 5 minutes
9	Carefully pipette** (do not pour) off the supernatant. Remove the tube from the magnet; this tube contains the isolated cells.	Discard supernatant
10	Repeat steps as indicated.	Steps 8 and 9 (total of 1 x 10-minute and 2 x 5-minute separations)
11	Resuspend cells in desired medium. Be sure to collect cells from the sides of the tube.	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 the EasyEights™ 14 mL tube use a 10 mL serological pipette [Catalog #38004]).

Directions for Use – Fully Automated RoboSep™ Protocol

See pages 1 and 2 for Sample Preparation and Recommended Medium. Refer to Table 3 for detailed instructions regarding the RoboSep™ procedure.

Table 3. RoboSep™ Human Whole Blood and Bone Marrow CD138 Positive Selection Kit II Protocol

STEP	INSTRUCTIONS	RoboSep™ (Catalog #21000)
1	Prepare sample within the volume range.	0.5 - 4.5 mL
	Add sample to required tube.	14 mL (17 x 95 mm) polystyrene round-bottom tube (e.g. Catalog #38008)
2	Add 1X EasySep™ RBC Lysis Buffer to sample.	Equal volume to sample
3	Select protocol. NOTE: Enter volume.	Human CD138 WB and BM Positive Selection II 17887 NOTE: Enter diluted sample volume.
4	Vortex RapidSpheres™. NOTE: Particles should appear evenly dispersed.	30 seconds
5	Load the carousel. NOTE: Do not vortex cocktail.	Follow on-screen prompts
	Start the protocol.	Press the green "Run" button
6	Unload the carousel when the run is complete. Remove the tube containing the isolated cells and resuspend in desired medium. Be sure to collect cells from the sides of the tube.	Isolated cells are ready for use

Notes and Tips

EASYSEPTM RED BLOOD CELL LYSIS BUFFER

EasySep™ Red Blood Cell Lysis Buffer is supplied as a 10X concentrate. Prepare 1X lysis buffer at least 1 hour before use by adding 1 part 10X lysis buffer to 9 parts distilled or Type 1 water. Mix gently and completely before use.

*Type I water refers to ultrapure water suitable for use in analytical procedures. It is defined by the American Society for Testing and Materials (ASTM) as having a resistivity of > 18 MΩ-cm, a conductivity of < 0.056 µS/cm, and < 50 ppb of total organic carbons (TOC).

ASSESSING PURITY

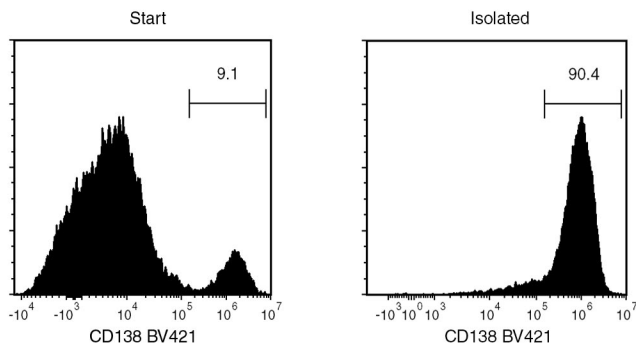
For purity assessment of CD138+ cells by flow cytometry, use the following fluorochrome-conjugated antibody clone:

- Anti-Human CD138 (Syndecan-1) Antibody, Clone MI15 (Catalog #60003)

One of the following methods can also be used:

- Stain for intracellular κ (kappa) and λ (lambda) light chains (e.g. procedure described by Ahmann et al.). Plasma cells express either the kappa or lambda light chain.
- Use alternative markers such as fluorochrome-conjugated Anti-Human CD38 Antibody, Clone HIT2 (Catalog #60014) and Anti-Human CD45 Antibody, Clone HI30 (Catalog #60018) to detect CD38+CD45 variable cells (Kumar et al.).
- Use a fluorochrome-conjugated secondary antibody, such as Goat Anti-Mouse IgG (H+L) Antibody, Polyclonal (Catalog #60138).

Data



Starting with fresh whole blood spiked with a multiple myeloma cell line, U266, the CD138+ cell content of the selected fraction typically ranges from 83.7 - 98.3%. In the above example, the purities of the start and final isolated fractions are 9.1% and 90.4%, respectively.

NOTE: For samples with CD138+ starting frequency < 10 - 15%, the CD138+ purity of the isolated fraction may be variable.

NOTE: Red blood cells were removed from the start sample by lysis prior to flow cytometry.

References

Ahmann GJ et al. (1998) A novel three-color, clone-specific fluorescence in situ hybridization procedure for monoclonal gammopathies. *Cancer Genet Cytogenet* 101(1): 7–11.

Kumar S et al. (2010) Immunophenotyping in multiple myeloma and related plasma cell disorders. *Best Pract Res Clin Haematol* 23(3): 433–51.

PRODUCTS ARE FOR RESEARCH USE ONLY AND NOT INTENDED FOR HUMAN OR ANIMAL DIAGNOSTIC OR THERAPEUTIC USES UNLESS OTHERWISE STATED. FOR ADDITIONAL INFORMATION ON QUALITY AT STEMCELL, REFER TO WWW.STEMCELL.COM/COMPLIANCE.

Copyright © 2021 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™ Human Whole Blood and Bone Marrow CD138 Positive Selection Kit II

Para procesar 60 mL de sangre total o médula

Catalog #17887

Selección positiva

No. de document #10000011550 | Version 00



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

ESPAÑOL

Descripción

Aísla células CD138+ (syndecan-1) altamente purificadas a partir de médula ósea o sangre total mediante selección positiva inmunomagnética.

- Rápido y fácil de usar
- No se requieren columnas.

Este kit se centra en células CD138+ para su selección positiva con anticuerpo, reconociendo el marcador de superficie CD138. Las células deseadas se etiquetan con anticuerpos y partículas magnéticas y son separadas sin columnas usando un imán EasySep™. Las células no deseadas son simplemente desechadas y las células deseadas quedan en el tubo. Las células aisladas estarán inmediatamente disponibles para aplicaciones subsiguientes como hibridación in situ fluorescente (FISH, en inglés), citometría de flujo, cultivos o extracción de ADN/ARN.

Descripción de los Componentes

NOMBRE DEL COMPONENTE	COMPONENTE N°	CANTIDAD	ALMACENAMIENTO	VIDA ÚTIL	FORMATO
EasySep™ Human Whole Blood and Bone Marrow CD138 Positive Selection Kit II Cocktail	17887C	3 x 1 mL	Almacenar entre 2 °C a 8 °C. No congelar.	Estable hasta la fecha de vencimiento (EXP) de la etiqueta.	Una combinación de anticuerpos monoclonales en PBS con rHA al 0,09%. Incluye un anticuerpo bloqueador de receptor Fc.
EasySep™ Dextran RapidSpheres™ 50100	50100	3 x 1 mL	Almacenar entre 2 °C a 8 °C. No congelar.	Estable hasta la fecha de vencimiento (EXP) de la etiqueta.	Una suspensión de partículas magnéticas en agua.
EasySep™ Red Blood Cell Lysis Buffer, 10X Concentrate	20110	10 x 1 mL	Almacenar de 15 °C a 25 °C.	Estable hasta la fecha de vencimiento (EXP) de la etiqueta.	Un reactivo de lisis de eritrocitos concentrado a 10X.

PBS - Tampón fosfato salino; rHA - albumina humana recombinante

Los componentes pueden transportarse a temperatura ambiente (de 15 °C a 25 °C), pero deben almacenarse según se indica anteriormente.

Información Adicional Sobre La Estabilidad del Reactivo

NOMBRE DEL REACTIVO	ALMACENAMIENTO	VIDA ÚTIL
Tampón de lisis de eritrocitos EasySep™ (dilución 1X)	Almacenar entre 2 °C a 8 °C. No congelar.	Estable hasta 3 meses. No exceder la fecha de vencimiento (EXP) del componente original.

Preparación de la Muestra

Para muestras frescas y congeladas, consulte www.stemcell.com/primarycells.

SANGRE PERIFÉRICA

Recolectar la sangre total en un tubo de extracción sanguínea que contenga anticoagulante.

MÉDULA ÓSEA

Para evitar la degradación de la muestra y la pérdida de CD138 de los plasmocitos, las muestras deben procesarse lo antes posible y dentro de 72 horas tras su recolección.

1. Diluir la muestra entre 5 a 10 veces en D-PBS (sin Ca++ ni Mg++, n° de catálogo 37350) y mezclar suavemente pipeteando arriba y abajo.
2. OPCIONAL (recomendado): Humedecer un filtro de 70 µm con D-PBS. Filtrar la muestra a través del filtro humedecido y retirar los fragmentos óseos, agregados celulares y restos. Lavar el filtro con D-PBS.
3. Centrifugar las células a 300 x g, durante 10 minutos sin freno.
4. Con una pipeta, retirar cuidadosamente el plasma y desecharlo sin tocar el pellet celular. No verter.

OPCIONAL: Con muestras de médula ósea de más de 24 horas, añadir Solución DNase I (1 mg/mL, n° de catálogo 07900) a 100 µg/mL del volumen de muestra original para ayudar a reducir la aglutinación de células. La Solución DNase I puede añadirse directamente a los pellets mezclando suavemente. Incubar a temperatura ambiente (de 15 °C a 25 °C) de 15 a 30 minutos antes de iniciar el protocolo EasySep™.

NOTA: Evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación de la Solución DNase I.

5. Resuspensión del pellet con el tampón EasySep™:

- Si la muestra tiene una celularidad baja o si el volumen de la muestra es ≥ 2.5 mL, vuelva a suspender al volumen original de la muestra.
- Si el volumen de la muestra es < 2.5 mL y tiene celularidad alta o desconocida, vuelva a suspenderla a dos veces el volumen original de la muestra.


Medio Recomendado

Tampón EasySep™ (n° de catálogo 20144), tampón RoboSep™ (n° de catálogo 20104), o PBS que contenga suero fetal bovino al 2% (FBS) y 1 mM EDTA. El medio debe estar libre de Ca^{++} y Mg^{++} .

Instrucciones de uso – Protocolos EasySep™ manuales

Consultar las páginas 6 y 7 para la preparación de muestra y el medio recomendado. Remítase a las tablas 1 y 2, para instrucciones detalladas respecto de procedimiento EasySep™.


Tabla 1. Protocolo de EasySep™ Human Whole Blood and Bone Marrow CD138 Positive Selection Kit II

		IMÁN EASYSEP™
		<p>El imán «The Big Easy» de EasySep™ (n° de catálogo 18001)</p> 
1	Prepare la muestra dentro del rango de volumen.	0,5 - 4,5 mL
	Añada la muestra al tubo requerido.	Tubo de poliestireno de fondo redondo de 14 mL (17 mm x 95 mm) (p. ej., n° de catálogo 38008)
2	Añada a la muestra tampón de lisis de eritrocitos EasySep™ 1X.	Igualé el volumen a la muestra
3	Añada el cóctel de selección a la muestra. NOTA: No mezclar el cóctel con vortex.	25 μ L/mL de muestra diluida
	Mezcle e incube.	TA durante 3 minutos
4	Vortex RapidSpheres™. NOTA: Las partículas deben verse uniformemente dispersas.	30 segundos
5	Añada RapidSpheres™ a la muestra.	25 μ L/mL de muestra diluida
	Mezcle e incube.	TA durante 3 minutos
6	Añada el medio recomendado para rellenar la muestra hasta el volumen indicado. Mezcle pipeteando suavemente arriba y abajo 2 ó 3 veces.	<ul style="list-style-type: none"> • Resuspenda hasta 5 mL las muestras diluidas de $< 2,5$ mL • Resuspenda hasta 10 mL las muestras diluidas de $\geq 2,5$ mL
	Coloque el tubo (sin tapa) dentro del imán e incube.	TA durante 10 minutos
7	Recoja el imán y, con un movimiento continuo, invierta el imán y el tubo*, desechando el sobrenadante. Retire el tubo del imán, este tubo contiene las células aisladas.	Deseche el sobrenadante
8	Añada el medio recomendado para rellenar la muestra hasta el volumen indicado. Mezcle pipeteando suavemente arriba y abajo 2 ó 3 veces.	<ul style="list-style-type: none"> • Resuspenda hasta 5 mL las muestras diluidas de $< 2,5$ mL • Resuspenda hasta 10 mL las muestras diluidas de $\geq 2,5$ mL
	Coloque el tubo (sin tapa) dentro del imán e incube.	TA durante 3 minutos
9	Recoja el imán y, con un movimiento continuo, invierta el imán y el tubo*, desechando el sobrenadante. Retire el tubo del imán, este tubo contiene las células aisladas.	Deseche el sobrenadante.
10	Repita los pasos según se indican.	Los pasos 8 y 9 (total de 1 separación de 10 minutos y 2 de 3 minutos)
11	Vuelva a resuspender las células en el medio deseado. Asegúrese de recoger las células de las paredes del tubo.	Las células aisladas están listas para usarse

TA - temperatura ambiente (de 15 °C a 25 °C)

* Deje el imán y el tubo invertidos de 2 a 3 segundos, luego vuelva a ponerlo de pie. No sacuda ni seque las gotas que puedan quedar colgando de la boca del tubo.

Tabla 2. Protocolo de EasySep™ Human Whole Blood and Bone Marrow CD138 Positive Selection Kit II

		IMÁN EASYSEP™	
PASO	INSTRUCCIONES		EasyEights™ (n° de catálogo 18103)
		Tubo de 14 mL	
1	Prepare la muestra dentro del rango de volumen.	0,5 - 4,5 mL	
	Añada la muestra al tubo requerido.	Tubo de poliestireno de fondo redondo de 14 mL (17 mm x 95 mm) (p. ej., n° de catálogo 38008)	
2	Añadir a la muestra tampón de lisis de eritrocitos EasySep™ a 1X.	Igualé el volumen a la muestra	
3	Añada el cóctel de selección a la muestra. NOTA: No mezclar el cóctel con vortex.	25 µL/mL de muestra diluida	
	Mezcle e incube.	TA durante 3 minutos	
4	Vortex RapidSpheres™. NOTA: Las partículas deben verse uniformemente dispersas.	30 segundos	
5	Añada RapidSpheres™ a la muestra.	25 µL/mL de muestra diluida	
	Mezcle e incube.	TA durante 3 minutos	
6	Añada el medio recomendado para rellenar la muestra al volumen indicado. Mezcle pipeteando suavemente arriba y abajo 2 ó 3 veces.	<ul style="list-style-type: none"> Resuspenda hasta 5 mL las muestras diluidas de < 2,5 mL Resuspenda hasta 10 mL las muestras diluidas de ≥ 2,5 mL 	
	Coloque el tubo (sin tapa) dentro del imán e incube.	TA durante 10 minutos	
7	Pipetee cuidadosamente** (no vierta) para desechar el sobrenadante. Retire el tubo del imán, este tubo contiene las células aisladas.	Deseche el sobrenadante.	
8	Añada el medio recomendado para rellenar la muestra hasta el volumen indicado. Mezcle pipeteando suavemente arriba y abajo 2 ó 3 veces.	<ul style="list-style-type: none"> Resuspenda hasta 5 mL las muestras diluidas de < 2,5 mL Resuspenda hasta 10 mL las muestras diluidas de ≥ 2,5 mL 	
	Coloque el tubo (sin tapa) dentro del imán e incube.	TA durante 5 minutos	
9	Pipetee cuidadosamente** (no vierta) para desechar el sobrenadante. Retire el tubo del imán, este tubo contiene las células aisladas.	Deseche el sobrenadante	
10	Repita los pasos según se indican.	Los pasos 8 y 9 (total de 1 separación de 10 minutos y 2 de 5 minutos)	
11	Vuelva a suspender las células en el medio deseado. Asegúrese de recoger las células de las paredes del tubo.	Las células aisladas están listas para usarse	


TA - temperatura ambiente (de 15 °C a 25 °C)

** Recoja todo el sobrenadante de una vez en el interior de una sola pipeta (p. ej., para tubos EasyEights™ de 14 mL, use una pipeta serológica de 10 mL [n° de catálogo 38004]).

Instrucciones de Uso – Protocolo RoboSep™ completamente automático

Consultar las páginas 6 y 7 para la preparación de muestra y el medio recomendado. Remítase a la tabla 3, para instrucciones detalladas respecto de procedimiento RoboSep™.

Tabla 3 Protocolo de RoboSep™ Human Whole Blood and Bone Marrow CD138 Positive Selection Kit II

PASO	INSTRUCCIONES	RoboSep™ (n° de catálogo 21000)	
1	Prepare la muestra dentro del rango de volumen.	0,5 - 4,5 mL	
	Añada la muestra al tubo requerido.	Tubo de poliestireno de fondo redondo de 14 mL (17 mm x 95 mm) (p. ej., n° de catálogo 38008)	
2	Añadir a la muestra tampón de lisis de eritrocitos EasySep™ a 1X.	Igualé el volumen a la muestra	
3	Seleccione el protocolo. NOTA: Poner el volumen	Human CD138 WB and BM Positive Selection II 17887 NOTA: Ingresar el volumen de la muestra diluida	
4	Vortex RapidSpheres™. NOTA: Las partículas deben verse uniformemente dispersas.	30 segundos	
5	Cargue el carrusel. NOTA: No mezclar el cóctel con vortex.	Siga los mensajes en pantalla	
	Inicie el protocolo.	Pulse el botón verde «Run»	
6	Descargue el carrusel cuando termine la ejecución. Retire el tubo que contiene las células aisladas y vuelva a suspenderlas en el medio deseado. Asegúrese de recoger las células de las paredes del tubo.	Las células aisladas están listas para usarse	

Notas y Consejos

TAMPÓN DE LISIS DE ERITROCITOS EASYSEP™

El tampón de lisis de eritrocitos EasySep™ se provee como concentrado a 10X. Prepare un tapón de lisis de 1X al menos 1 hora antes de añadir 1 parte de tampón de lisis a 10X a 9 partes de agua destilada o de Tipo 1. Mezcle suave y completamente antes de usarla.

*El agua Tipo I se refiere a agua ultrapura adecuada para usarse en procedimientos analíticos. Según la Sociedad Americana para Pruebas y Materiales (ASTM, siglas en inglés), posee una resistividad de > 18 MΩ-cm, una conductividad de < 0,056 µS/cm y carbono orgánico total (TOC) de < 50 ppb.

CÓMO EVALUAR LA PUREZA

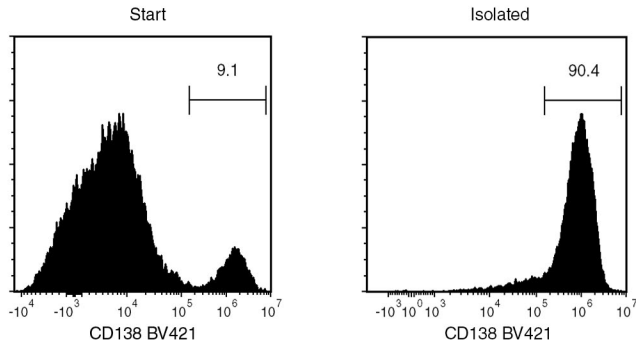
Para evaluar la pureza de las células CD138+ mediante citometría de flujo, emplee el siguiente clon de anticuerpos conjugados con fluorocromo:

- Anti-Human CD138 (Syndecan-1) Antibody, Clon MI15 (n° de catálogo 60003)

Se puede emplear uno de los siguientes métodos:

- Tinción de cadenas ligeras intracelulares κ (kappa) y λ (lambda) (procedimiento de ejemplo descrito en Ahmann et al.). Los plasmocitos expresan la cadena ligera de kappa o lambda.
- Emplee marcadores alternativos como Anti-Human CD38 Antibody, Clon HIT2 (n° de catálogo 60014) y Anti-Human CD45 Antibody, Clon HI30 (n° de catálogo 60018) conjugados con fluorocromo para detectar células variables CD38+CD45 (Kumar et al.).
- Usar un anticuerpo secundario conjugado con fluorocromo, como Goat Anti-Mouse IgG (H+L) Antibody, Polyclonal (n° de catálogo 60138).

Datos



Comenzando con sangre total fresca enriquecida con una línea celular de mieloma múltiple, U266, el contenido celular de CD138+ de la fracción seleccionada normalmente fluctúa entre 83,7% y 98,3%. En el ejemplo anterior, las purzas de las fracciones aisladas inicial y final son 9.1% y 90.4%, respectivamente.

NOTA: En muestras de CD138+ con una frecuencia de inicio de < 10 - 15%, la pureza de CD138+ de la fracción aislada puede ser variable.

NOTA: Se retiraron los eritrocitos de la muestra inicial mediante lisis antes de la citometría de flujo.

Referencias

Ahmann GJ et al. (1998) A novel three-color, clone-specific fluorescence in situ hybridization procedure for monoclonal gammopathies. *Cancer Genet Cytogenet* 101(1): 7-11.

Kumar S et al. (2010) Immunophenotyping in multiple myeloma and related plasma cell disorders. *Best Pract Res Clin Haematol* 23(3): 433-51.

LOS PRODUCTOS SON SOLO PARA USO EN INVESTIGACIONES Y NO ESTÁN PREVISTOS PARA DIAGNÓSTICO HUMANO NI ANIMAL, NI USOS TERAPÉUTICOS, SALVO QUE SE INDIQUE LO CONTRARIO. PARA OBTENER INFORMACIÓN ADICIONAL SOBRE LA CALIDAD EN STEMCELL, REMÍTASE A WWW.STEMCELL.COM/COMPLIANCE.

Copyright © 2021 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 facilitada por STEMCELL y sus proveedores sea correcta, no ofrece garantías ni declaraciones cuanto a la exactitud de dicha información.

EasySep™ Human Whole Blood and Bone Marrow CD138 Positive Selection Kit II

Para processamento de 60 mL de sangue total ou de medula óssea

Núm. de catálogo 17887

Seleção positiva

Documento nº 10000011550 | Versão 00



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

PORTUGUÊS

Descrição

Isolamento de células CD138+ (sindecano-1) altamente purificadas de medula óssea ou sangue total frescos por meio de seleção positiva imunomagnética.

- Rápido e fácil de utilizar
- Não são necessárias colunas

Este kit alveja as células CD138+ para seleção positiva com um anticorpo que reconhece o marcador de superfície CD138. As células desejadas são marcadas com anticorpos e partículas magnéticas e separadas sem colunas utilizando um ímã EasySep™. As células não desejadas são simplesmente despejadas enquanto as células desejadas ficam no tubo. As células isoladas estão imediatamente disponíveis para várias aplicações, tais como a hibridização fluorescente in situ (FISH, em inglês), citometria de fluxo, cultura ou extração de ADN/ARN.

Descrição dos Componentes

NOME DO COMPONENTE	N.º DO COMPONENTE	QUANTIDADE	ARMAZENAMENTO	PRAZO DE VALIDADE	FORMATO
EasySep™ Human Whole Blood and Bone Marrow CD138 Positive Selection Kit II Cocktail	17887C	3 x 1 mL	Armazenar a 2 - 8 °C. Não congelar.	Estável até à data de validade (EXP) indicada no rótulo.	Uma combinação de anticorpos monoclonais em PBS com 0,09% rHA. Inclui um recetor Fc de bloqueio de anticorpo.
EasySep™ Dextran RapidSpheres™ 50100	50100	3 x 1 mL	Armazenar a 2 - 8 °C. Não congelar.	Estável até à data de validade (EXP) indicada no rótulo.	Uma suspensão de partículas magnéticas em água.
EasySep™ Red Blood Cell Lysis Buffer, 10X Concentrate	20110	1 x 10 mL	Armazenar a 15 - 25 °C.	Estável até à data de validade (EXP) indicada no rótulo.	Um reagente para lise de hematies concentrado a 10X.

PBS - solução salina tamponada com fosfato; rHA - albumina recombinante humana

Os componentes podem ser enviados à temperatura ambiente (15 - 25 °C), mas devem ser armazenados conforme indicado acima.

Informação Adicional Sobre a Estabilidade do Reagente

NOME DO REAGENTE	ARMAZENAMENTO	PRAZO DE VALIDADE
Tampão de Lise de hematies EasySep™ (diluição a 1X)	Armazenar a 2 - 8 °C. Não congelar.	Estável durante até 3 meses. Não exceder a data de validade (EXP) do componente original.

Preparação da Amostra

Para amostras frescas e congeladas disponíveis, consultar www.stemcell.com/primarycells.

SANGUE PERIFÉRICO

Recolher sangue total num tubo de colheita de sangue contendo um anticoagulante.

MEDULA ÓSSEA

Para evitar a degradação da amostra e a perda de CD138 das células plasmáticas frágeis, as amostras devem ser processadas tão rapidamente quanto possível e no prazo de 72 horas após a colheita.

1. Diluir a amostra 5 a 10 vezes em D-PBS (sem Ca++ e Mg++; núm. de catálogo 37350) e misturar suavemente com a pipeta.
2. OPCIONAL (recomendado): Molhar previamente um filtro de 70 µm com D-PBS. Filtrar a amostra pelo filtro previamente molhado para retirar fragmentos de osso, agregados de células e detritos. Lavar o filtro com D-PBS.
3. Centrifugar as células a 300 x g durante 10 minutos sem o travão.
4. Usando a pipeta, retirar cuidadosamente e descartar o plasma, sem perturbar o pellet celular. Não despejar.

OPCIONAL: Para amostras de medula óssea com menos de 24 horas, adicionar DNase I Solução (1 mg/mL; núm. de catálogo 07900) a 100 µg/mL do volume da amostra original para ajudar a reduzir a aglomeração de células. A DNase I Solução pode ser adicionada diretamente às células agregadas com uma mistura suave. Incubar à temperatura ambiente (15 - 25 °C) durante 15 a 30 minutos antes de iniciar o protocolo EasySep™.

NOTA: Evitar os ciclos repetitivos de congelar-descongelar da DNase I Solução.

5. Ressuspender o pellet celular com o Tampão EasySep™:
- Se a amostra tiver uma baixa celularidade, ou se o volume da amostra for $\geq 2,5$ mL, ressuspender ao volume da amostra original.
 - Se o volume da amostra for inferior a 2,5 mL e tiver uma alta celularidade ou a celularidade for desconhecida, ressuspender a duas vezes o volume da amostra original.


Meio Recomendado

Tampão EasySep™ (núm. de catálogo 20144), Tampão RoboSep™ (núm. de catálogo 20104) ou PBS contendo 2% de soro fetal bovino (FBS) e 1 mM de EDTA. O meio deve estar isento de Ca^{++} e Mg^{++} .

Instruções de Utilização – Protocolos Manuais do EasySep™

Consultar páginas 11 e 12 para ver a "Preparação da Amostra" e o "Meio Recomendado". Consultar as Tábuas 1 e 2 para ver instruções pormenorizadas sobre o procedimento do EasySep™.


Tabela 1. Protocolo do EasySep™ Human Whole Blood and Bone Marrow CD138 Positive Selection Kit II

		ÍMAN EASYSEP™
ETAPA	INSTRUÇÕES	Íman "Big Easy" EasySep™ (Núm. de catálogo 18001) 
1	Preparar a amostra dentro da variação de volume.	0,5 - 4,5 mL
	Adicionar a amostra ao tubo correto.	Tubo de 14 mL (17 x 95 mm) de poliestireno com fundo arredondado (p. ex., núm. de catálogo 38008)
2	Adicionar 1X Tampão de Lise de hematies EasySep™ à amostra.	Volume igual à amostra
3	Adicionar Cocktail de Seleção à amostra. NOTA: Não agitar o cocktail em vórtex.	25 μ L/mL de amostra diluída
	Misturar e incubar.	TA durante 3 minutos
4	Vortex RapidSpheres™. NOTA: As partículas devem estar igualmente dispersas.	30 segundos
5	Adicionar RapidSpheres™ à amostra.	25 μ L/mL de amostra diluída
	Misturar e incubar.	TA durante 3 minutos
6	Adicionar o meio recomendado para encher a amostra até ao volume indicado. Misturar com a pipeta 2 - 3 vezes.	<ul style="list-style-type: none"> • Encher até 5 mL para amostras diluídas < 2,5 mL • Encher até 10 mL para amostras diluídas $\geq 2,5$ mL
	Colocar o tubo (sem tampa) num íman e incubar.	TA durante 10 minutos
7	Pegar no íman e num só movimento contínuo inverter o imã e o tubo,* despejando o sobrenadante. Retirar o tubo do íman; este tubo contém as células isoladas.	Descartar o sobrenadante
8	Adicionar o meio recomendado para encher a amostra até ao volume indicado. Misturar com a pipeta 2 - 3 vezes.	<ul style="list-style-type: none"> • Encher até 5 mL para amostras diluídas < 2,5 mL • Encher até 10 mL para amostras diluídas $\geq 2,5$ mL
	Colocar o tubo (sem tampa) num íman e incubar.	TA durante 3 minutos
9	Pegar no íman e num só movimento contínuo inverter o imã e o tubo,* despejando o sobrenadante. Retirar o tubo do imã; este tubo contém as células isoladas.	Descartar o sobrenadante
10	Repetir as etapas como indicado.	Etapas 8 e 9 (separações num total de 1 x 10 minutos e 2 x 3 minutos)
11	Ressuspender as células no meio desejado. Não esquecer de recolher as células nos lados do tubo.	As células isoladas estão prontas para uso

TA - temperatura ambiente (15 - 25 °C)

* Deixar o íman e o tubo invertido durante 2 - 3 segundos, depois voltar a virar para cima. Não agitar nem absorver as gotas que possam ficar presas no bocal do tubo.

Tabela 2. Protocolo do EasySep™ Human Whole Blood and Bone Marrow CD138 Positive Selection Kit II

		ÍMAN EASYSEP™	
		EasyEights™ (núm. de catálogo 18103)	
		Tubo de 14 mL	
			
			0,5 - 4,5 mL
1	Preparar a amostra dentro da variação de volume.		
	Adicionar a amostra ao tubo correto.		Tubo de 14 mL (17 x 95 mm) de poliestireno com fundo arredondado (p. ex., núm. de catálogo 38008)
2	Adicionar 1X Tampão de Lise de hematies EasySep™ à amostra.		Volume igual à amostra
3	Adicionar Cocktail de Seleção à amostra. NOTA: Não agitar o cocktail em vórtex.		25 µL/mL de amostra diluída
	Misturar e incubar.		TA durante 3 minutos
4	Vortex RapidSpheres™. NOTA: As partículas devem estar igualmente dispersas.		30 segundos
5	Adicionar RapidSpheres™ à amostra.		25 µL/mL de amostra diluída
	Misturar e incubar.		TA durante 3 minutos
6	Adicionar o meio recomendado para encher a amostra até ao volume indicado. Misturar com a pipeta 2 - 3 vezes.		<ul style="list-style-type: none"> • Encher até 5 mL para amostras diluídas < 2,5 mL • Encher até 10 mL para amostras diluídas ≥ 2,5 mL
	Colocar o tubo (sem tampa) num íman e incubar.		TA durante 10 minutos
7	Com cuidado, pipetar** (não despejar) o sobrenadante para fora. Retirar o tubo do íman; este tubo contém as células isoladas.		Descartar o sobrenadante
8	Adicionar o meio recomendado para encher a amostra até ao volume indicado. Misturar com a pipeta 2 - 3 vezes.		<ul style="list-style-type: none"> • Encher até 5 mL para amostras diluídas < 2,5 mL • Encher até 10 mL para amostras diluídas ≥ 2,5 mL
	Colocar o tubo (sem tampa) num íman e incubar.		TA durante 5 minutos
9	Com cuidado, pipetar** (não despejar) o sobrenadante para fora. Retirar o tubo do íman; este tubo contém as células isoladas.		Descartar o sobrenadante
10	Repetir as etapas como indicado.		Etapas 8 e 9 (separações num total de 1 x 10 minutos e 2 x 5 minutos)
11	Ressuspender as células no meio desejado. Não esquecer de recolher as células nos lados do tubo.		As células isoladas estão prontas para uso


TA - temperatura ambiente (15 - 25 °C)

** Recolher todo o sobrenadante, todo de uma vez, numa só pipeta (por exemplo, com o tubo EasyEights™ de 14 mL, utilizar uma pipeta serológica de 10 mL [núm. de catálogo 38004]).

Instruções de Utilização – Protocolo do RoboSep™ Totalmente Automatizado

Consultar páginas 11 e 12 para ver a "Preparação da Amostra" e o "Meio Recomendado". Consultar a Tabela 3 para ver instruções pormenorizadas relativamente ao procedimento do RoboSep™.

Tabela 3. Protocolo do RoboSep™ Human Whole Blood and Bone Marrow CD138 Positive Selection Kit II

ETAPA	INSTRUÇÕES	RoboSep™ (núm. de catálogo 21000)	
1	Preparar a amostra dentro da variação de volume.	0,5 - 4,5 mL	
	Adicionar a amostra ao tubo correto.	Tubo de 14 mL (17 x 95 mm) de poliestireno com fundo arredondado (p. ex., núm. de catálogo 38008)	
2	Adicionar 1X Tampão de Lise de hematies EasySep™ à amostra.	Volume igual à amostra	
3	Selecionar o protocolo. NOTA: Introduzir o volume.	Human CD138 WB and BM Positive Selection II 17887 NOTA: Introduzir o volume da amostra diluída.	
4	Vortex RapidSpheres™. NOTA: As partículas devem estar igualmente dispersas.	30 segundos	
5	Carregar o carrossel. NOTA: Não agitar o cocktail em vórtex.	Seguir as indicações que aparecem no ecrã	
	Iniciar o protocolo.	Pressionar o botão verde "Run" (Executar)	
6	Descarregar o carrossel quando o processo tiver terminado. Retirar o tubo contendo as células isoladas e ressuspender no meio desejado. Não esquecer de recolher as células nos lados do tubo.	As células isoladas estão prontas para uso	

Notas e sugestões

TAMPÃO DE LISE DE HEMATIES EASYSEP™

O Tampão de Lise de hematies EasySep™ é fornecido como um concentrado a 10X. Preparar 1X tampão de lise, pelo menos 1 hora antes do uso, adicionando 1 parte de tampão de lise a 10X a 9 partes de água destilada ou Tipo 1. Misturar suavemente e completamente antes do uso.

*A água de Tipo 1 refere-se a água ultra pura adequada para uso em procedimentos analíticos. É definida pela American Society for Testing and Materials (ASTM - Sociedade Americana para Testes e Materiais) como tendo uma resistividade de > 18 MΩ-cm, uma condutividade de < 0,056 µS/cm e < 50 ppb de carbono orgânico total (COT).

AValiação da Pureza

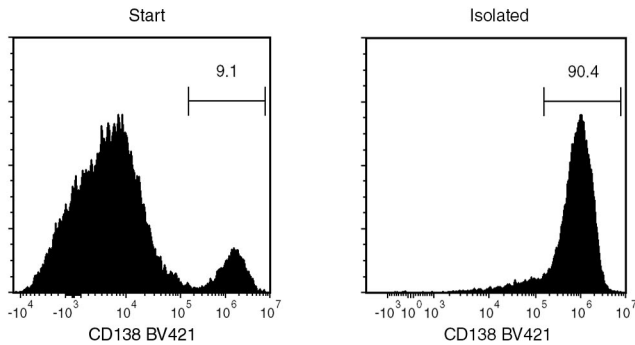
Para avaliar a pureza das células CD138+ por meio de citometria de fluxo, utilizar o seguinte clone de anticorpo conjugado com fluorocromo:

- Anti-Human CD138 (Syndecan-1) Antibody, Clone MI15 (núm. de catálogo 60003)

Também pode ser utilizado um dos seguintes métodos:

- Marcar as cadeias leves intracelulares κ (kappa) e λ (lambda) (por exemplo, o procedimento descrito por Ahmann et al.). As células de plasma expressam a cadeia leve kappa ou lambda.
- Utilizar marcadores alternativos, tais como o Anti-Human CD38 Antibody, Clone HIT2 com fluorocromo, Clone HIT2 (núm. de catálogo 60014) e o Anti-Human CD45 Antibody, Clone HI30 (núm. de catálogo 60018) para detetar as células variáveis CD38+CD45 (Kumar et al.).
- Utilizar um anticorpo secundário conjugado com fluorocromo, tal como o Goat Anti-Mouse IgG (H+L) Antibody, Polyclonal (núm. de catálogo 60138).

Dados



Começando com sangue total fresco marcado com uma linha de células de mieloma múltiplo, U266, o conteúdo de células CD138+ da fração selecionada varia, tipicamente, entre 83,7 - 98,3%. No exemplo acima, as purezas das frações isoladas inicial e final são 9,1% e 90,4%, respectivamente.

NOTA: Para amostras com uma frequência inicial de CD138+ < 10 - 15%, a pureza de CD138+ da fração isolada pode ser variável.

NOTA: Os hematíes foram retirados da amostra inicial por meio de lise, antes da citometria de fluxo.

Referências

Ahmann GJ et al. (1998) A novel three-color, clone-specific fluorescence in situ hybridization procedure for monoclonal gammopathies. *Cancer Genet Cytogenet* 101(1): 7–11.

Kumar S et al. (2010) Immunophenotyping in multiple myeloma and related plasma cell disorders. *Best Pract Res Clin Haematol* 23(3): 433–51.

OS PRODUTOS SÃO SOMENTE PARA UTILIZAÇÃO EM INVESTIGAÇÃO E NÃO SE DESTINAM A DIAGNÓSTICO EM HUMANOS OU ANIMAIS NEM A UTILIZAÇÃO TERAPÊUTICA, SALVO ESPECIFICAÇÃO EM CONTRÁRIO. PARA OBTER MAIS INFORMAÇÕES SOBRE A QUALIDADE NA STEMCELL, CONSULTAR WWW.STEMCELL.COM/COMPLIANCE.

Copyright © 2021 by STEMCELL Technologies Inc. Todos os direitos reservados, incluindo gráficos e imagens. STEMCELL Technologies & Design, STEMCELL Shield Design, Scientists Helping Scientists, EasyEights, EasySep, RapidSpheres, e RoboSep são marcas comerciais da STEMCELL Technologies Canada Inc. Todas as outras marcas comerciais são propriedade dos seus respectivos proprietários. Apesar de a STEMCELL ter feito todos os esforços razoáveis para assegurar que a informação fornecida pela STEMCELL e seus fornecedores está correta, não são dadas quaisquer garantias ou representações quanto à exatidão ou integralidade dessa informação.