

RosetteSep™ Human Multiple Myeloma Cell Enrichment Cocktail



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

Catalog #15129 1 x 2 mL For processing 40 mL bone marrow
Catalog #15169 5 x 2 mL For processing 200 mL bone marrow

Document #10000012475 | Version 00

ENGLISH

Description

Enrich untouched human multiple myeloma cells (B and plasma cells) from fresh human whole bone marrow by negative selection.

- Fast and easy-to-use
- Requires no special equipment or training
- Untouched, viable cells

This kit targets non-multiple myeloma cells for removal with antibodies recognizing specific cell surface markers. The RosetteSep™ antibody cocktail crosslinks unwanted cells in human whole blood to multiple red blood cells (RBCs), forming immunorosettes. This increases the density of the unwanted (rosetted) cells, such that they pellet along with the free RBCs when centrifuged over a density gradient medium. Desired cells are never labeled with antibody and are easily collected as a highly enriched population at the interface between the plasma and the density gradient medium. Isolated cells are immediately available for downstream applications such as flow cytometry, cell culture, or DNA/RNA extraction.

Component Descriptions

COMPONENT NAME	COMPONENT #	QUANTITY	STORAGE	SHELF LIFE	FORMAT
RosetteSep™ Human Multiple Myeloma Enrichment Cocktail	15129C	2 mL	Store at 2 - 8°C. Do not freeze.	Stable until expiry date (EXP) on label.	A combination of monoclonal antibodies in PBS.

PBS - phosphate-buffered saline

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

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

Sample Preparation

BONE MARROW

Use an unprocessed bone marrow sample.

Although RosetteSep™ has been optimized for use with whole blood or bone marrow, cells can be enriched from other sources (i.e. buffy coat) provided that RBCs are present at a ratio of at least 100 RBCs per nucleated cell. The concentration of nucleated cells in the sample should not exceed 5×10^7 cells/mL.

Recommended Medium

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline with 2% Fetal Bovine Serum (Catalog #07905).

Density Gradient Medium

Lymphoprep™ (Catalog #07801) or other density gradient medium with a density of 1.077 g/mL.

Directions for Use – RosetteSep™ Protocol

See page 1 for Sample Preparation and Recommended Medium.

Ensure that bone marrow sample, recommended medium, density gradient medium, and centrifuge are all at room temperature (15 - 25°C).

Table 1. RosetteSep™ Human Multiple Myeloma Cell Enrichment Cocktail Protocol

STEP	INSTRUCTIONS	ROSETTESEP™
1	Collect sample.	Up to 15 mL per tube (see Table 2)
2	Add RosetteSep™ Cocktail to sample. NOTE: Do not vortex cocktail.	50 µL/mL of sample
	Mix and incubate.	RT for 20 minutes
3	Dilute sample with recommended medium and mix gently.	Equal volume to sample
4	Add density gradient medium to required tube.	See Table 2 for volumes and tubes
5	Add diluted sample to the tube containing the density gradient medium.	Layer diluted sample on density gradient medium, being careful to minimize their mixing
6	Centrifuge.	1200 x g for 20 minutes, brake off
7	Collect enriched cells. * For platelet removal see footnote below.	Harvest enriched cell layer with a pipette and transfer to new tube**
8	Wash enriched cells.	Top up with recommended medium
9	Centrifuge.	300 x g for 10 minutes brake low
		Discard supernatant
10	Repeat steps as indicated.	Steps 8 and 9***
11	Resuspend cells in recommended medium.	The enriched cells are ready for use

RT - room temperature (15 - 25°C)

* To minimize platelet contamination, remove and discard the top third of the plasma layer before collecting the cells at the density gradient medium:plasma interface. Platelets may also be removed by including an extra wash with centrifugation at 120 x g for 10 minutes at room temperature with no brake after step 9.

** Sometimes it is difficult to see the cells at the interface. It is recommended to remove some of the density gradient medium along with the pre-enriched cells in order to ensure complete recovery.

*** One of the wash steps can be done with Ammonium Chloride Solution (Catalog #07800) prior to flow cytometry analysis or if residual RBCs will interfere with subsequent assays.

Table 2. Recommended Volumes and Tube Sizes

BONE MARROW VOLUME	RECOMMENDED MEDIUM VOLUME	TUBE SIZE	DENSITY GRADIENT MEDIUM VOLUME
0.5 mL	0.5 mL	5 mL	1.5 mL
1 mL	1 mL	5 mL	1.5 mL
2 mL	2 mL	14 mL	3 mL
3 mL	3 mL	14 mL	3 mL
4 mL	4 mL	14 mL	4 mL
5 mL	5 mL	50 mL	15 mL
10 mL	10 mL	50 mL	15 mL
15 mL	15 mL	50 mL	15 mL

* Small bubbles may be present in the density gradient medium after pipetting. This will not affect performance.

Notes and Tips

CONVERSION OF g TO RPM

To convert g to RPM, use the following formula:

$$\text{RPM} = \sqrt{\frac{\text{RCF}}{(1.118 \times 10^{-5}) \times (\text{Radius})}}$$

Where: RCF = relative centrifugal force (g)
RPM = centrifuge speed in revolutions per minute
Radius = radius of rotor in cm

ASSESSING PURITY

For purity assessment of human multiple myeloma cells by flow cytometry, use the following fluorochrome-conjugated antibody clone:

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

NOTE: The purity of enriched cells is dependent on the percentage of myeloma cells in the starting bone marrow sample. Typical purity is > 95% when measured by anti-CD138 labeling.

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, and RosetteSep are trademarks of STEMCELL Technologies Canada Inc. Lymphoprep is a trademark of Alere Technologies. 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.

RosetteSep™ Human Multiple Myeloma Cell Enrichment Cocktail



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

Catalog #15129 1 x 2 mL Para procesamiento de 40 mL de médula ósea
Catalog #15169 5 x 2 mL Para procesamiento de 200 mL de médula ósea

No. de document #10000012475 | Version 00

ESPAÑOL

Descripción

Enriquecer células intactas de mieloma múltiple humano (células B y plasmáticas) a partir de médula ósea humana total fresca mediante selección negativa.

- Rápido y fácil de usar
- No requiere equipamiento ni capacitación especiales
- Células viables intactas

Este kit se centra en células que no son de mieloma múltiple para su remoción con anticuerpos, reconociendo marcadores específicos de superficie celular. El coctel de anticuerpos RosetteSep™ entrecruza células no deseadas, en sangre humana total, con glóbulos rojos formando inmunorosetas. Esto aumenta la densidad de las células no deseadas (roseteadas), de modo que se sedimentan junto con los glóbulos rojos libres cuando se centrifugan sobre un medio de gradiente de densidad. Las células deseadas nunca se marcan con anticuerpos, y se pueden recolectar fácilmente como población altamente enriquecida entre el plasma y el medio de gradiente de densidad. Las células aisladas estarán inmediatamente disponibles para aplicaciones subsiguientes como citometría de flujo, cultivo celular o extracción de ADN/ARN.

Descripción de los Componentes

NOMBRE DEL COMPONENTE	COMPONENTE Nº	CANTIDAD	ALMACENAMIENTO	VIDA ÚTIL	FORMATO
RosetteSep™ Human Multiple Myeloma Enrichment Cocktail	15129C	2 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.

PBS - Tampón fosfato salino

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

Se observa precipitado en el vial del coctel, pero no afectará el rendimiento.

Preparación de Muestra

MÉDULA ÓSEA

Utilice una muestra de médula ósea no procesada.

Aunque RosetteSep™ se ha optimizado para usarse con sangre total o médula ósea, las células pueden enriquecerse a partir de otras fuentes (como, capa leucocitaria) siempre que los glóbulos rojos estén presentes en una proporción de al menos 100 glóbulos rojos por célula nucleada. La concentración de células nucleadas en la muestra no debe exceder 5×10^7 células/mL.

Medio Recomendado

Solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco con 2% de suero bovino fetal (nº de catálogo 07905).

Medio de Gradiente de Densidad

Lymphoprep™ (nº de catálogo 07801) u otro medio de gradiente de densidad con una densidad de 1,077 g/mL.

Instrucciones de uso – Protocolo RosetteSep™

Consultar la página 4 para la preparación de muestra y el medio recomendado.

Asegúrese de que la muestra de médula ósea, el medio recomendado, el medio de gradiente de densidad y la centrifuga estén todos a temperatura ambiente (de 15°C a 25°C).

Tabla 1. Protocolo de RosetteSep™ Human Multiple Myeloma Cell Enrichment Cocktail

PASO	INSTRUCCIONES	ROSETTESEP™
1	Recolectar la muestra.	Hasta 15 mL por tubo (consultar la tabla 2).
2	Añada el cóctel RosetteSep™ a la muestra. NOTA: No mezclar el cóctel con vortex.	50 µL/mL de muestra
	Mezcle e incube.	TA durante 20 minutos
3	Diluya la muestra con el medio recomendado y mezcle suavemente.	Igual el volumen a la muestra
4	Añada el medio de gradiente de densidad al tubo requerido.	Consulte en la tabla 2 los volúmenes y tubos
5	Añada la muestra diluida al tubo que contiene el medio de gradiente de densidad.	Estratificar la muestra diluida en el medio de gradiente de densidad teniendo cuidado de minimizar su mezcla
6	Centrifugar.	1200 x g, durante 20 minutos con el freno quitado
7	Recolectar las células enriquecidas. * Para la remoción de plaquetas, consulte las notas al pie.	Recoger la capa celular enriquecida con una pipeta y transferirla a un nuevo tubo**
8	Lavar las células enriquecidas.	Rellenar con el medio recomendado
9	Centrifugar.	300 x g durante 10 minutos con el freno bajo
		Deseche el sobrenadante
10	Repita los pasos según se indican.	Pasos 8 y 9***
11	Resuspender las células en el medio recomendado.	Las células enriquecidas están listas para usarse

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

* Para minimizar la contaminación de plaquetas, retire y deseche el tercio superior de la capa plasmática antes de recolectar las células en el medio de gradiente de densidad: interfaz de plasma. Las plaquetas también pueden retirarse incluyendo un lavado extra con centrifugado a 120 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente sin freno después del paso 9.

** Algunas veces es difícil ver las células en el anillo. Se recomienda retirar algo del medio de gradiente de densidad junto con las células preenriquecidas para poder garantizar una recuperación completa.

*** Uno de los pasos de lavado puede hacerse con solución de cloruro de amonio (nº de catálogo 07800), antes del análisis por citometría de flujo, o si los glóbulos rojos residuales interfirieran con ensayos subsiguientes.

Tabla 2. Volúmenes y Tamaños de Tubo Recomendados

VOLUMEN DE MÉDULA ÓSEA	VOLUMEN DE MEDIO RECOMENDADO	TAMAÑO DE TUBO	VOLUMEN DEL MEDIO DE GRADIENTE DE DENSIDAD
0,5 mL	0,5 mL	5 mL	1,5 mL
1 mL	1 mL	5 mL	1,5 mL
2 mL	2 mL	14 mL	3 mL
3 mL	3 mL	14 mL	3 mL
4 mL	4 mL	14 mL	4 mL
5 mL	5 mL	50 mL	15 mL
10 mL	10 mL	50 mL	15 mL
15 mL	15 mL	50 mL	15 mL

* Pueden encontrarse pequeñas burbujas en el medio de gradiente de densidad después de pipetear. Esto no afectará el rendimiento.

Notas y Consejos

CONVERSIÓN DE g A RPM

Para convertir g a RPM, use la fórmula siguiente:

$$\text{RPM} = \sqrt{\frac{\text{RCF}}{(1.118 \times 10^{-5}) \times (\text{Radius})}}$$

Donde: RCF = fuerza centrífuga relativa (g)
RPM = velocidad de centrifuga en revoluciones por minuto
Radius = radio del rotor en cm

CÓMO EVALUAR LA PUREZA

Para evaluar la pureza de las células de mieloma múltiple humano 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)

NOTA: La pureza de las células enriquecidas depende del porcentaje de células de mieloma en la muestra inicial de médula ósea. La pureza típica es > 95% cuando se mide mediante marcaje anti-CD138.

LOS PRODUCTOS SON SOLO PARA USO EN INVESTIGACIONES Y NO ESTAN PREVISTOS PARA DIAGNOSTICO HUMANO NI ANIMAL, NI USOS TERAPEUTICOS, SALVO QUE SE INDIQUE LO CONTRARIO. PARA OBTENER INFORMACION ADICIONAL SOBRE LA CALIDAD EN STEMCELL, REMITASE 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 y RosetteSep son marcas comerciales de STEMCELL Technologies Canada Inc. Lymphoprep es una marca comercial de Alere Technologies. Todas las 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.