

本产品说明书适用于 **ROBOSEP™ (A 部分)**、**紫色 EASYSEP™ 磁极 (B 部分)**，或 **“THE BIG EASY” 银色 EASYSEP™ 磁极 (C 部分)**。

如果使用其它 EasySep™ 磁极，请访问 www.stemcell.com 下载与磁极相应的产品说明书，或发邮件至 techsupport@stemcell.com，与 STEMCELL Technologies 公司的技术支持部门联系。

A) 使用 ROBOSEP™ 进行全自动分选的操作流程。

该操作流程适用于处理 **0.5 - 8 mL** 的样品 (多达 8×10^8 个细胞)。

1. 在推荐的缓冲液 (见“提示及窍门”部分) 中制备浓度为 1×10^8 个细胞/mL 的细胞悬液。细胞须置于 14 mL 的聚苯乙烯试管 (17 x 100 mm) 中，以便恰好装入 RoboSep™ 操作台上的磁极中。对于 **每 mL 细胞**，加入 **50 μ L** 的大鼠血清 (试剂盒中已提供) (例如：对于 2 mL 的细胞悬液，则加入 100 μ L 的大鼠血清)。

推荐使用 **Falcon® 14 mL 聚苯乙烯圆底试管 (Corning®, 产品号 #352057)**。

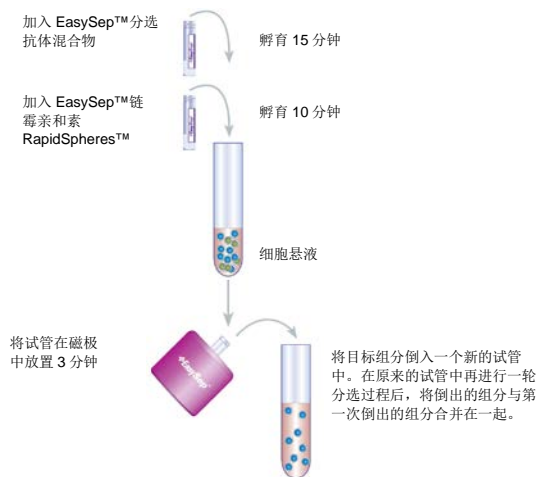
2. 选择适合的 RoboSep™ 操作程序：

- Mouse Hematopoietic Progenitor Cell Isolation 19856

如需修改上述 RoboSep™ 操作程序，请发邮件至 techsupport@stemcell.com，与 STEMCELL Technologies 公司的技术支持部门联系。

3. 在进行加样之前，先对 EasySep™ 链霉亲和素 RapidSpheres™ 50001 涡旋震荡 30 秒钟，以确保 RapidSpheres™ 均匀混悬，没有可见的聚集体。
4. 根据显示屏上的操作提示向 RoboSep™ 操作台加载样品和试剂。当所有物品均加载到相应的象限后，按下绿色的“Run (运行)”按钮。RoboSep™ 将开始对所有细胞进行标记，并执行分选操作。
5. 当细胞分选完成后，从位于枪头盒左侧的 50 mL 试管中收集分离后的细胞。经分离的细胞可立即用于下游应用。

EASYSEP™ 手动操作流程图示



B) 使用紫色 EASYSEP™ 磁极 (产品号 #18000) 进行 EASYSEP™ 手动分选的操作流程。

该操作流程适用于处理 **0.5 - 2 mL** 的样品 (多达 2×10^8 个细胞)。

1. 在推荐的缓冲液 (见“提示及窍门”部分) 中制备浓度为 1×10^8 个细胞/mL 的细胞悬液。细胞须置于 5 mL 的聚苯乙烯试管 (12 x 75 mm) 中，以便恰好装入 EasySep™ 磁极中。对于 **每 mL 细胞**，加入 **50 μ L** 的大鼠血清 (试剂盒中已提供) (例如：对于 2 mL 的细胞悬液，则加入 100 μ L 的大鼠血清)。

推荐使用 **Falcon® 5 mL 聚苯乙烯圆底试管 (Corning®, 产品号 #352058)**。

2. 对于 **每 mL 细胞**，加入 **50 μ L** 的 EasySep™ 小鼠造血祖细胞分选抗体混合物 (例如：对于 2 mL 的细胞悬液，则加入 100 μ L 的抗体混合物)。混合均匀，在 $2 - 8^\circ\text{C}$ 下孵育 **15 分钟**。
3. 将 EasySep™ 链霉亲和素 RapidSpheres™ 50001 涡旋震荡 30 秒钟，以确保 RapidSpheres™ 均匀混悬，没有可见的聚集体。
4. 对于 **每 mL 细胞**，加入 **75 μ L** 的 EasySep™ 链霉亲和素 RapidSpheres™ 50001 (例如：对于 2 mL 的细胞悬液，则加入 150 μ L 的 RapidSpheres™)。混合均匀，在 $2 - 8^\circ\text{C}$ 下孵育 **10 分钟**。
5. 通过加入推荐的缓冲液使细胞悬液的总体积达到 **2.5 mL**。轻轻上下吹打细胞悬液 2 - 3 次以将其混合均匀。将试管 (不带盖) 放置于磁极中，在室温下 ($15 - 25^\circ\text{C}$) 放置 **3 分钟**。

6. 拿起 EasySep™ 磁极，连贯地将磁极和试管倒置，将目标组分倾倒入一个新的 **14 mL 试管** 中 (第一轮倾倒入)。将磁极及试管在倒置状态下保持 2 - 3 秒钟后再恢复正立状态。请勿摇晃或通过管口接触可能仍挂在试管口的液滴。

注意：用于收集倒出的组分的试管容积必须 $> 5 \text{ mL}$ (如 **Falcon™ 14 mL 聚苯乙烯圆底试管**)。

7. 从磁极中取出原来的试管，并加入 **2.5 mL** 的推荐缓冲液。轻轻上下吹打细胞悬液 5 - 6 次以将其混合均匀。再将试管 (不带盖) 放回磁极中，在室温下 ($15 - 25^\circ\text{C}$) 放置 **3 分钟**。
8. 拿起 EasySep™ 磁极，连贯地将磁极和试管倒置，将目标组分倾倒入装有第一次倒出的组分的 **14 mL 试管** 中。经磁珠标记、不需要的细胞由于受 EasySep™ 磁极的磁场作用，仍将留在原来的试管中。将磁极及试管在倒置状态下保持 2 - 3 秒钟后再恢复正立状态。请勿摇晃或通过管口接触可能仍挂在试管口的液滴。在 **14 mL 试管** 中被分离出来的细胞可立即用于下游应用。

C) 使用“THE BIG EASY”银色 EASYSEP™ 磁极 (产品号 #18001) 进行 EASYSEP™ 手动分选的操作流程。

该操作流程适用于处理 **0.5 - 8 mL** 的样品 (多达 8×10^8 个细胞)。

1. 在推荐的缓冲液 (见“提示及窍门”部分) 中制备浓度为 1×10^8 个细胞/mL 的细胞悬液。细胞须置于 14 mL 的聚苯乙烯试管 (17 x 100 mm) 中，以便恰好装入 “The Big Easy” EasySep™ 磁极中。对于 **每 mL 细胞**，加入 **50 μ L** 的大鼠血清 (试剂盒中已提供) (例如：对于 2 mL 的细胞悬液，则加入 100 μ L 的大鼠血清)。

推荐使用 **Falcon® 14 mL 聚苯乙烯圆底试管 (Corning®, 产品号 #352057)**。

2. 对于 **每 mL 细胞**，加入 **50 μ L** 的 EasySep™ 小鼠造血祖细胞分选抗体混合物 (例如：对于 2 mL 的细胞悬液，则加入 100 μ L 的抗体混合物)。混合均匀，在 $2 - 8^\circ\text{C}$ 下孵育 **15 分钟**。
3. 将 EasySep™ 链霉亲和素 RapidSpheres™ 50001 涡旋震荡 30 秒钟，以确保 RapidSpheres™ 均匀混悬，没有可见的聚集体。
4. 对于 **每 mL 细胞**，加入 **75 μ L** 的 EasySep™ 链霉亲和素 RapidSpheres™ 50001 (例如：对于 2 mL 的细胞悬液，则加入 150 μ L 的 RapidSpheres™)。混合均匀，在 $2 - 8^\circ\text{C}$ 下孵育 **10 分钟**。
5. 通过加入推荐的缓冲液使细胞悬液的总体积达到 **5 mL** (对于 $\leq 4 \times 10^8$ 个细胞) 或 **10 mL** (对于 $4 - 8 \times 10^8$ 个细胞)。轻轻上下吹打细胞悬液 2 - 3 次以将其混合均匀。将试管 (不带盖) 放置于磁极中，在室温下 ($15 - 25^\circ\text{C}$) 放置 **3 分钟**。

6. 拿起 EasySep™ 磁极，连贯地倾倒入一个新的 **14 mL 或 50 mL 试管** 中 (第一轮倾倒入)。将磁极及试管在倒置状态下保持 2 - 3 秒钟后再恢复正立状态。请勿摇晃或通过管口接触可能仍挂在试管口的液滴。

注意：如果起始样本的体积 $> 4 \text{ mL}$ (即 $4 - 8 \times 10^8$ 个细胞)，用于收集倒出的组分的试管容积必须 $> 20 \text{ mL}$ (如 **Falcon™ 50 mL 聚苯乙烯圆底试管**)。

7. 从磁极中取出原来的试管，并加入 **5 mL** (用于 $< 4 \times 10^8$ 个细胞) 或 **10 mL** (用于 $4 - 8 \times 10^8$ 个细胞) 的推荐缓冲液。轻轻上下吹打细胞悬液 5 - 6 次以将其混合均匀。再将试管 (不带盖) 放回磁极中，在室温下 ($15 - 25^\circ\text{C}$) 放置 **3 分钟**。
8. 拿起 EasySep™ 磁极，连贯地倾倒入装有第一次倒出的组分的 **14 mL 或 50 mL 试管** 中。经磁珠标记、不需要的细胞由于受 EasySep™ 磁极的磁场作用，仍将留在原来的试管中。将磁极及试管在倒置状态下保持 2 - 3 秒钟后再恢复正立状态。请勿摇晃或通过管口接触可能仍挂在试管口的液滴。在 **14 mL 或 50 mL 试管** 中被分离出来的细胞可立即用于下游应用。

STEMCELL TECHNOLOGIES INC. 的质量管理体系已经过 ISO 13485 医疗器械标准认证。
仅供研究使用。不可用于人或动物的诊断或治疗。



STEMCELL Technologies China Co. Ltd. • 中国上海市黄浦区湖滨路 150 号企业天地 5 号 2336 室 • 邮编 200021

电话: +86 400 885 9050 • E-MAIL: INFO.CN@STEMCELL.COM • 欲查询全球联系方式，请访问 WWW.STEMCELL.COM

版本 1.0.1

文档号 #28035CN

产品号 #19856用于标记多达 10^9 个细胞**组分**

- EasySep™小鼠造血祖细胞分选抗体混合物 0.5 mL
- EasySep™链霉亲和素 RapidSpheres™ 50001 1 mL
- 大鼠血清 2 mL

**NEGATIVE SELECTION****所需设备:**

EasySep™磁极 (产品号 #18000), 或 “The Big Easy” EasySep™磁极 (产品号 #18001), 或 RoboSep™全自动细胞分选仪。

产品描述:

EasySep™小鼠造血祖细胞分选试剂盒是用于从骨髓 (BM) 单细胞悬液中分离出血干干细胞和祖细胞 (HSPCs)。那些表达不需要的谱系抗原 - (CD5, CD11b, CD19, CD45R, Ly6G/C [Gr-1], TER119, 7-4) 的阳性细胞被生物素抗体所标记, 然后通过 EasySep™链霉亲和素 RapidSpheres™ 50001 将其去除。分选过程使用 EasySep™磁极进行, 无需分离柱。最终将需要的细胞倒入一个新试管中。

提示及窍门:

制备单细胞悬液: 使用配有 23 号针头的注射器, 从股骨和胫骨中将骨髓细胞冲洗到推荐的缓冲液中。将细胞悬液轻轻地通过注射器几次, 以打散细胞聚集体。或用研钵将骨头碾碎。将细胞悬液通过 70 μ m 孔径的尼龙过滤器去除剩余的细胞聚集体和碎片。在 300 x g 下离心 10 分钟后, 用推荐的缓冲液制备成浓度为 1×10^6 个/mL 的细胞悬液。

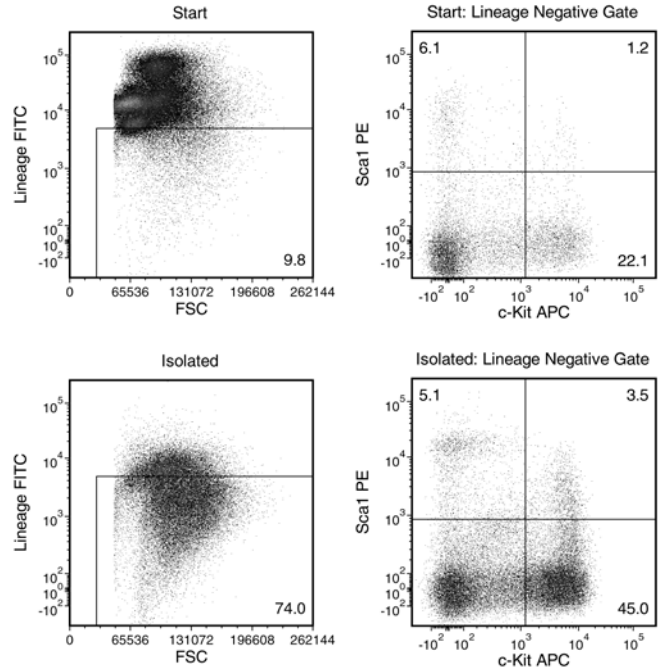
推荐缓冲液: 推荐使用 RoboSep™缓冲液 (产品号 #20104), 或 EasySep™缓冲液 (产品号 #20144), 或含 2% 胎牛血清 (FBS) 及 1 mM 乙二胺四乙酸 (EDTA) 的 PBS 缓冲液。缓冲液中不应含 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 及生物素。

纯度检测: 从骨髓中分离小鼠 HSPCs 的第一步需去除成熟的细胞, 这些细胞具有表达于最终分化的血细胞上的 “谱系 (Lineage, Lin)” 特异性抗原。HSPCs 不表达谱系特异性抗原, 或只呈弱表达。谱系特异性抗原包括: CD3, CD11b, CD19, CD45R/B220, Ly6G/C (Gr-1) 和 TER119。在许多小鼠品系中, HSPCs 对于 Sca1 (Ly-6A/E) 和 c-Kit (SCF 的受体, 也称为 CD117) 呈阳性, 因此被称为 LSK (Lin-Sca1+c-Kit+) ^{1,2,3,4}。LSK 细胞在骨髓的有核细胞中所占的比例 < 0.1%, 大部分为具有重建能力的干细胞, 而较为成熟的红系、髓系和巨核细胞 (包括大部分集落形成单位 (Colony Forming Units, CFUs), 为 Lin-Sca1-/low c-Kit+, 则不包括在内⁵。至于其它抗原, 如 CD34 和 Thy1, 小鼠 HSPCs 有异质性表达。

祖细胞经富集后, 这些亚型可以使用带荧光标记的抗谱系抗原、c-Kit、Sca1、CD34 和/或 Thy1.1 的抗体进行标记, 然后通过流式分析进行纯度检测。用于标记谱系抗原的推荐抗体为: fluorochrome 标记的抗 CD3 (克隆 145-2C11, 产品号 #60015)、抗 CD11b (克隆 M1/70, 产品号 #60001)、抗 CD19 (克隆 6D5, 产品号 #60006)、抗 CD45R (克隆 RA3-6B2, 产品号 #60019)、抗 Gr-1 (克隆 RB6-8C5, 产品号 #60028) 和抗 TER119 (克隆 TER-119, 产品号 #60033)。

参考文献:

1. Spangrude GJ, et al. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* 241(4861): 58-62, 1988
2. Uchida N, Weissman IL. Searching for hematopoietic stem cells: evidence that Thy-1.1^{lo} Lin⁻ Sca1⁺ cells are the only stem cells in C57BL/Ka-Thy-1.1 bone marrow. *J Exp Med* 175(1): 175-184, 1992
3. Okada S et al. In vivo and in vitro stem cell function of c-kit and Sca-1-positive murine hematopoietic cells. *Blood* 80(12): 3044-3050, 1992
4. Osawa M et al. In vivo self-renewal of c-Kit+ Sca-1+ Lin(low/-) hemopoietic stem cells. *J Immunol* 156(9):3207-3214, 1996
5. Akashi K, et al. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404(6774): 193-197, 2000

EASYSEP™小鼠造血祖细胞分选典型结果图示:

起始样本为小鼠骨髓细胞悬液, 分选组中谱系抗原阴性细胞的纯度通常可达 84%。

组分说明:

EASYSEP™小鼠造血祖细胞分选抗体混合物 产品号 #19856
该抗体混合物包含多种生物素标记的单克隆抗体, 用于标记小鼠造血源性细胞的表面抗原 (CD5, CD11b, CD19, CD45R, Ly-6G/C [Gr-1], TER119, 7-4)。该抗体混合物溶于 PBS 和 0.1% 的牛血清白蛋白 (BSA) 中。需要注意的是, 本产品为生物试剂, 不可能完全描述和量化, 出现某些差异不可避免。

EASYSEP™链霉亲和素 RAPIDSpheres™ 50001 产品号 #50001
溶于 PBS、包被有链霉亲和素的磁珠悬液。

大鼠血清 产品号 #13551
用于防止大鼠抗体与小鼠细胞发生非特异性结合反应。血清经生产商确认不含支原体。

稳定性和储存条件:

EASYSEP™小鼠造血祖细胞分选抗体混合物

EASYSEP™链霉亲和素 RAPIDSpheres™ 50001

以上产品可在 2 - 8°C 下稳定保存, 直至标签上的保质期。其成分已通过无菌测试。不可冷冻储存。本产品可以在室温 (15 - 25°C) 下运输, 货物送达后请存放在冰箱冷藏层内。

大鼠血清

该产品可在 -20°C 下稳定保存, 直至标签上的保质期。在 2 - 8°C 存放时至少可稳定保存 2 个月。其成分已通过无菌测试。

版权所有 © STEMCELL Technologies Inc. 2013。保留一切权利, 包括图形和图像。STEMCELL Technologies 和其设计 & 徽标, 以及 Scientists Helping Scientists、EasySep 和 RoboSep 均是 STEMCELL Technologies Inc. 的注册商标。Falcon 是 Corning 的注册商标。其它注册商标为各自持有人的产权。

STEMCELL TECHNOLOGIES INC. 的质量管理体系已经过 ISO 13485 医疗器械标准认证。
仅供研究使用。不可用于人或动物的诊断或治疗。



STEMCELL Technologies China Co. Ltd. • 中国上海市黄浦区湖滨路 150 号企业天地 5 号 2336 室 • 邮编 200021

版本 1.0.1

电话: +86 400 885 9050 • E-MAIL: INFO.CN@STEMCELL.COM • 欲查询全球联系方式, 请访问 WWW.STEMCELL.COM

文档号 #28035CN