



使用指南

确认血液样本、含 2%胎牛血清的磷酸盐缓冲液（PBS+2% FBS，产品号 #07905）、密度梯度离心液（见“提示及窍门”部分），以及离心机的温度均为室温（15 - 25°C）。

1. 对于**每 mL**全血，加入 **50 μL** 的 RosetteSep™含抗 CD36 的 CTC 富集抗体混合物（例如：对于 2 mL 全血，则加入 100 μL 的抗体混合物）。混合均匀。

注意：如果样本不是新鲜全血，请见“提示及窍门”部分。

2. 在室温下（15 - 25°C）孵育 **20 分钟**。
3. 加入相同体积的 PBS+2% FBS 以稀释样本，轻轻将其混合。
4. 将稀释的样本加至密度梯度离心液上面

或

将密度梯度离心液加至稀释的样本下面。

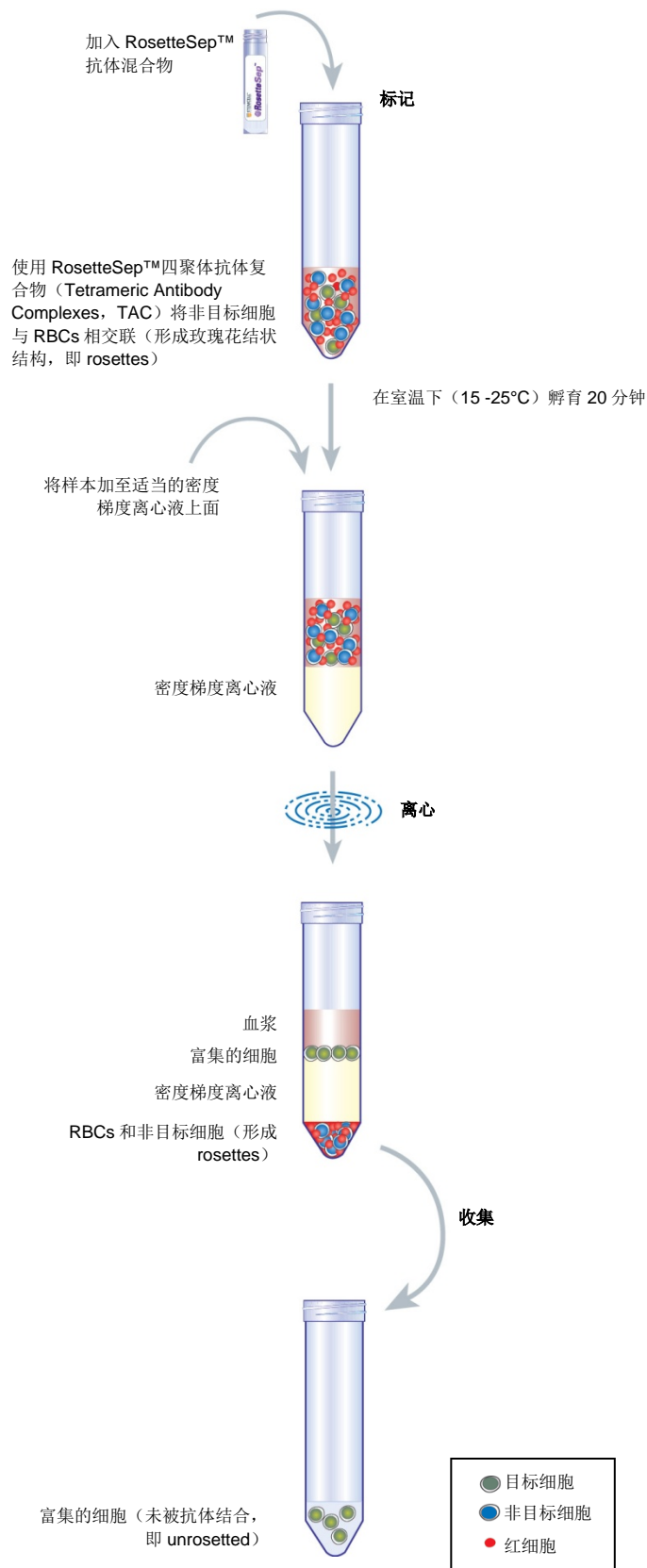
注意：请小心操作，以尽量减少密度梯度离心液和样本的混合。

推荐的体积请见下表。在使用 50 mL 离心管时，建议使用至少 15 mL 的密度梯度离心液，以更轻松地移取被富集的细胞层。

全血 (mL)	PBS + 2% FBS (mL)	密度梯度离心液 (mL)	试管规格 (mL)
1	1	1.5	5
2	2	3	14
3	3	3	14
4	4	4	14
5	5	15	50
10	10	15	50
15	15	15	50

5. 关闭刹车，以 1200 x g（见“提示及窍门”部分）于室温（15 - 25°C）下离心 **20 分钟**。
6. 从密度梯度离心液和血浆之间的界面移取富集细胞。
注意：有时候（特别是在富集一些含量很少的细胞时），被富集的细胞层在密度梯度离心液和血浆之间的界面处不是非常明显，因此建议将一些密度梯度离心液连同富集细胞一同移出，以确保细胞被完全回收。
7. 使用 PBS+2% FBS 清洗富集细胞，并重复一次。
8. 富集细胞即可用于下游实验。我们建议：若下游实验是进行流式分析、或其它会受残余红细胞（RBCs）影响的实验，可在进行下游实验前先用氯化铵处理富集细胞样本，以裂解残余 RBCs（进行流式分析前，可将裂解步骤作为清洗步骤之一）。

ROSETTESEP™操作流程图示



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治疗或诊断。



产品号 #15127 2 mL 用于标记 40 mL 全血
 产品号 #15167 10 mL 用于标记 200 mL 全血



产品描述及应用:

RosetteSep™ 含抗 CD36 的 CTC 富集抗体混合物, 用于从全血中富集上皮肿瘤细胞。

使用 ROSETTESEP™ 对人细胞进行标记:

RosetteSep™ 抗体混合物将人全血中非目标细胞与样本中大量的 RBCs 相交叉, 形成免疫玫瑰花结状结构 (图 1)。这将增加非目标细胞 (形成 rosettes) 的密度, 通过适当的密度梯度离心液离心时, 非目标细胞将与 RBCs 一起沉落。目标细胞未经抗体标记, 且高度富集, 可在密度梯度离心液与血浆之间的界面处被轻松收集。

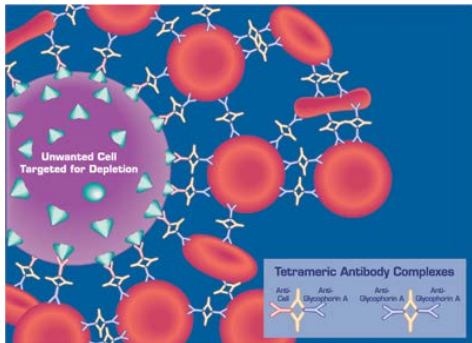


图 1.
 通过 RosetteSep™ 四聚体抗体复合物 (TAC), 将非目标细胞与 RBCs 交叉而形成的玫瑰花结状结构 (rosette)。

提示及窍门:

推荐缓冲液
 推荐使用 PBS + 2% FBS (产品号 #07905)。

密度梯度离心液
 可使用 Lymphoprep™ (产品号 #07801)、Ficoll-Paque™ PLUS, 或其它类似的密度梯度离心液。

将 g 转化为 RPM
 使用以下公式将 g 转化为 RPM:

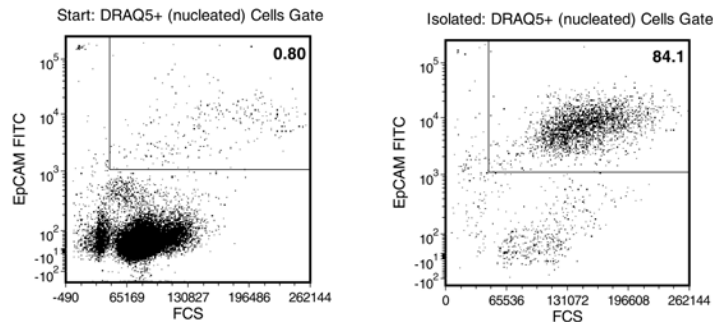
$$RPM = \sqrt{\frac{RCF}{(1.118 \times 10^{-5}) \times (\text{Radius})}}$$

该公式中: RPM = 离心机每分钟的转数
 RCF = 相对离心力 (g)
 Radius = 离心机转子半径 (cm)

对于不是全血的样本
 尽管 RosetteSep™ 已优化于使用全血, 但也可以用于从其它样本中富集细胞 (即: 白膜层、细胞单采术样本)。该样本中有核细胞的浓度不可超过 5×10^7 个/mL, 且 RBCs 相对于有核细胞的比例至少应为 50 - 100 : 1。

纯度检测
 上皮肿瘤细胞的纯度可以使用带荧光标记的肿瘤特异性抗体, 通过流式分析进行检测。

ROSETTESEP™ CTC 富集典型结果图示:



在上例中, CAMA (上皮肿瘤细胞系) 细胞以 0.8% 的起始比例接种于全血中。富集组分中 CAMA 细胞的含量为 84%。对目标 CD45+ 细胞的去除通常可达 4.7 个对数级。

组分说明:

RosetteSep™ CTC 富集抗体混合物 **产品号 #15127C**
 该抗体混合物包含多种小鼠和大鼠的单克隆抗体。这些抗体连接于可特异性结合人的造血细胞表面抗原 (CD2, CD16, CD19, CD36, CD38, CD45 和 CD66b), 和 RBCs 上的血型糖蛋白 A 的四聚体抗体混合物 (TAC) 上。小鼠的单克隆抗体亚型为 IgG1。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。

稳定性和储存条件:
ROSETTESEP™ 含抗 CD36 的 CTC 富集抗体混合物
 该产品可在 2 - 8°C 下稳定保存, 直至标签上的保质期。不可冷冻储存。其成分已通过无菌测试。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。

版权所有 © STEMCELL Technologies Inc. 2013. 保留一切权利, 包括图形和图像。STEMCELL Technologies 和其设计及徽标, 以及 Scientists Helping Scientists 和 RosetteSep 均是 STEMCELL Technologies Inc. 的注册商标。Lymphoprep 是 AXIS-SHIELD 的注册商标。Ficoll-Paque PLUS 是 GE Healthcare Limited 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治疗或诊断。

