

Kit de sélection Corning® X-MINI® des CD8 humains

Mode d'emploi

CORNING

Informations générales

Contenu du kit (Cat. No. 6910)

Nom du composant	Quantité	Format	Stockage
Biotine Souris Anticorps anti-CD8 humain	Flacon de 2,0 mL	Isotype : IgG 1 kappa de souris ; solution tampon contenant de la BSA et 0,09 % d'azide de sodium	Stocker entre 2 °C et 8 °C. NE PAS CONGELER
Réactif Corning X-BACS™	1 flacon	Lyophilisé	Stocker entre 2 °C et 8 °C. NE PAS CONGELER
Tampon Corning X-BACS	1 x 125 mL	DPBS, EDTA 2 mM, [-] Ca ²⁺ [-] Mg ²⁺	Stocker entre 2 °C et 30 °C.
Seringue, 10 mL	1	Stérile	Température ambiante
Aiguille 21G x 1 ½"	2	Stérile	Température ambiante
Capuchon de seringue	10	Stérile	Température ambiante

Capacité du produit PBMC ~ 3,6 x 10⁸

Tous les composants sont à usage unique. Les dates d'expiration sont indiquées sur l'étiquette des composants.

Légende des symboles



Mise en garde



Se reporter à



Numéro du lot



Température de stockage



Fabriqué par



Garder au sec



Numéro de catalogue



Date d'expiration

Description

Le kit de sélection de CD8 X-MINI est destiné à la sélection de cellules CD8⁺ humaines à partir d'une fraction de cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC). Le protocole suivant détaille la sélection des cellules CD8⁺ à l'aide d'un anticorps biotinyllé. Les cellules sélectionnées sont immédiatement disponibles pour les applications en aval telles que la cytométrie en flux et l'expansion de la culture cellulaire.

Principe

La sélection des cellules cibles de base se fait en quatre étapes :

1. Ciblage des cellules CD8⁺ d'une fraction de PBMC préparée à l'aide d'un anticorps CD8 biotinyllé.
2. Liaison de microbulles recouvertes de streptavidine aux cellules cibles biotinyllées à l'aide de la technologie exclusive X-BACS.
3. Séparation des cellules cibles et non cibles par centrifugation. Recueil de la fraction de microbulles à l'aide de techniques de laboratoire standard.
4. Élimination des microbulles des cellules cibles en utilisant une pression positive pour récupérer la fraction de la cellule cible.

Tampon requis

Tampon X-BACS supplémenté pour obtenir une concentration finale de tampon à 1 % de BSA ou HSA, 2 mM EDTA dans du DPBS sans Ca^{2+} ni Mg^{2+} .

REMARQUE : Réfrigérer le tampon X-bacs entre 2 °C et 8°C après la supplémentation.

Matériel nécessaire (non fourni)

- ▶ Corning® X-MINI® Pressor (Corning 6915)
- ▶ Seringue de 10 mL (BD Biosciences 309604)
- ▶ Bouchons de seringues (BD Biosciences 305819)
- ▶ BSA (Sigma A3299)
- ▶ Tamis cellulaire (en option, par exemple, Corning 352340 ou 431750)
- ▶ Microtubes à centrifuger de 2 mL (par ex. Corning MCT-200-C-S)
- ▶ Agitateur rotatif (par ex. Labnet H5600 ou H5500)
- ▶ Solution saline (0,9 % NaCl)

Précautions

- ⚠ Suivre les procédures de laboratoire standard lors de l'utilisation de matériaux biologiques, d'objets pointus et tranchants et de déchets biologiques dangereux.
- ⚠ L'azide de sodium produit de l'acide hydrazoïque hautement toxique dans des conditions acides. Diluer les composés azotés dans l'eau courante avant de les jeter pour éviter l'accumulation de dépôts potentiellement explosifs dans la plomberie.
- ⚠ Les réactifs contenus dans ce kit contiennent de l'albumine sérique bovine obtenue auprès d'un fournisseur commercial. Les informations concernant l'origine de la source animale utilisée sont conservées par le fournisseur et mises à la disposition de Corning. Les déclarations de position fournies par le fournisseur indiquent que les sources d'origine de la matière bovine proviennent des États-Unis, du Canada et de l'Australie.
- ⚠ La sécurité et l'efficacité de ce dispositif pour *les indications d'utilisation in vivo* n'ont pas été établies.

Préparation de l'échantillon de PBMC et du réactif Corning X-BACS™

Préparation des PBMC

1. Préparer une suspension cellulaire unique de PBMC à partir de sang total par des méthodes traditionnelles ou à l'aide du système Corning X-LAB®. **Pour des résultats optimaux** : Filtrer les suspensions agrégées à travers un tamis cellulaire.
2. Après la préparation, remettre en suspension les cellules dans le tampon X-BACS à une densité cellulaire allant jusqu'à 3×10^7 cellules/mL.

Préparation du réactif Corning X- BACS

Remarque : Avant utilisation, attendre 15 minutes que le réactif X-BACS atteigne la température ambiante (20 °C à 25 °C).

1. Insérer l'aiguille de 21G x 1 ½" fournie dans le septum du réactif X-BACS comme événement de compensation de pression.
2. À l'aide de la seringue fournie et de la deuxième aiguille 21G x 1 ½", ajouter rapidement 6 mL de solution saline dans le flacon.
3. Retirez la seringue et l'aiguille de ventilation du flacon.
REMARQUE : Conserver les aiguilles et la seringue pour une utilisation ultérieure.
4. Agiter vigoureusement le réactif X-BACS pendant 10 secondes et laisser le flacon à température ambiante pendant 5 minutes.

5. Avant utilisation, mélanger vigoureusement le réactif X-BACS pendant 10 secondes, puis insérer l'aiguille de 21G x 1 ½" dans le septum pour compenser la pression. Retourner le flacon et insérer une deuxième aiguille de 21G x 1 ½" fixée à une seringue pour récupérer le volume de microbulles souhaité.

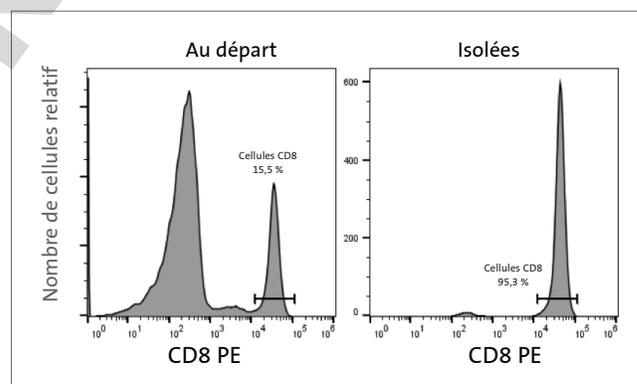


Sélection des cellules CD8

Les volumes de marquage et de sélection des cellules sont pour un maximum de 3×10^7 cellules totales par échantillon PBMC. Lorsque vous travaillez avec des numéros de cellules supérieurs à 3×10^7 , il convient d'augmenter proportionnellement les volumes de réactifs et les volumes totaux.

	Instructions	PBMC
1.	Mélanger soigneusement la préparation des échantillons et transférez les cellules dans un microtube de 2 mL	1 mL
2.	Ajouter le volume indiqué d'anticorps anti-CD8 pour chaque échantillon de 1 mL.	100 µL
3.	Mélanger à température ambiante et incubez à l'aide d'un agitateur rotatif.	30 minutes
4.	Après la période d'incubation, mélanger le réactif Corning® X-BACS™ et ajouter le volume indiqué dans chaque tube échantillon.	500 µL
5.	Mélanger à température ambiante et incuber à l'aide d'un agitateur rotatif pour lier les microbulles aux cellules marquées par les anticorps.	20 minutes
6.	Centrifuger les cellules pour la séparation.	5 Minute à 400 x g
7.	Pendant la centrifugation, préparer la seringue pour le dégazage des microbulles. Retirer le piston de la seringue de 10 mL et fixer un bouchon de seringue. REMARQUE : Ne pas réinsérer le piston à cette étape.	
8.	Pipeter soigneusement la couche de microbulles blanche avec une pipette de 200 µL et la transférer dans une seringue pré-bouchée. REMARQUE : Le transfert de la couche de microbulles nécessite plusieurs transferts avec la pipette.	
9.	Utiliser le tampon X-BACS pour laver les microbulles résiduelles adhérant sur les bords du tube d'échantillon ou de l'embout de la pipette et les ajouter à la seringue pré-bouchée. REMARQUE : Ne pas perturber le culot cellulaire. Les culots cellulaires restants sont la fraction cellulaire non désirée (négative).	
10.	Augmenter le volume de la seringue pré-bouchée de 10 mL contenant la couche de microbulles à un volume final de 3 mL avec du tampon X-BACS. Replacer le piston.	
11.	Bien mélanger l'échantillon par inversion. Passez immédiatement à l'écran suivant.	
12.	Le dégazage des microbulles peut être effectué à l'aide du filtre Corning X-MINI® Pressor ou manuellement. Corning X-MINI Pressor : Suivre les instructions de la notice du produit X-MINI Pressor. En bref : soulever la poignée et fixez fermement la seringue pré-bouchée sur le porte-seringue. Placer fermement le couvercle sur la seringue et tirer le piston vers le bas pendant 30 secondes pour dégazer l'échantillon microbulles-cellules. Soulever la poignée du levier lorsque vous avez terminé. Dégazage manuel : Appuyer rapidement et avec force sur le piston et le maintenir enfoncé pendant 30 secondes.	
13.	Répéter les étapes 11 et 12 (pour un total de 2 x 30 secondes d'étapes de dégazage). La suspension devient moins opaque.	
14.	Les cellules sélectionnées sont maintenant prêtes pour l'analyse et les applications en aval. REMARQUE : Pour la culture cellulaire, laver les cellules et remettez-les en suspension dans un milieu complet avant la culture.	

Exemple de données produites avec le Kit de sélection Corning X-MINI des CD8 humaines



À partir des PBMC humains, les cellules CD8⁺ ont été sélectionnées à l'aide de l'anticorps CD8 biotinylé et de la technologie X-BACS Corning. Les cellules ont été colorées par fluorescence avec du CD8-PE. Les débris cellulaires et les cellules mortes ont été exclus de l'analyse.

Pour des informations plus spécifiques sur les réclamations, consultez la page Certificats (Certificats) sur www.corning.com/lifesciences.

Garantie/Avis de non-responsabilité : sauf mention contraire, tous les produits sont destinés à la recherche uniquement. Ils ne doivent pas être utilisés dans les procédures diagnostiques ou thérapeutiques. Corning Life Sciences ne fait aucune déclaration relative à la performance de ces produits pour des applications cliniques ou diagnostiques.

Pour de plus amples informations techniques ou sur le produit, consultez www.corning.com/lifesciences ou appelez le 1.800.492.1110. En dehors des États-Unis, appelez le (+1) 978.442.2200 ou contactez votre distributeur Corning local.

CORNING

Corning Incorporated
Life Sciences

836 North St.
Building 300, Suite 3401
Tewksbury, MA 01876
t 800.492.1110
t 978.442.2200
f 978.442.2476

www.corning.com/lifesciences

ASIE/PACIFIQUE

Australie/Nouvelle-Zélande

t 61 427286832

Chine continentale

t 86 21 3338 4338

f 86 21 3338 4300

Inde

t 91 124 4604000

f 91 124 4604099

Japon

t 81 3-3586 1996

f 81 3-3586 1291

Corée

t 82 2-796-9500

f 82 2-796-9300

Singapour

t 65 6572-9740

f 65 6735-2913

Taiwan

t 886 2-2716-0338

f 886 2-2516-7500

EUROPE

CSEurope@corning.com

France

t 0800 916 882

f 0800 918 636

Allemagne

t 0800 101 1153

f 0800 101 2427

Pays-Bas

t 020 655 79 28

f 020 659 76 73

Royaume-Uni

t 0800 376 8660

f 0800 279 1117

Autres Pays Européens

t +31 (0) 206 59 60 51

f +31 (0) 206 59 76 73

AMERIQUE DU SUD

grupoLA@corning.com

Brésil

t 55 (11) 3089-7400

Mexique

t (52-81) 8158-8400

Pour une liste des marques de commerce, consultez www.corning.com/clstrademarks. Toutes les autres marques de commerce sont la propriété de leurs propriétaires respectifs.

Les systèmes Corning® X-SERIES® sont fabriqués pour Corning par ThermoGenesis Corp.