

GlioStem®: Bruksanvisning

1. Produktbeskrivning

Vissa polymerer, dvs, poly- och oligotiofener, har visat sig kunna korsa cellmembran utan ytterligare reagenser och fluorescera när de interagerar med vissa strukturer. GlioStem detekterar specifikt neurala stamceller och stamcellsliknande celler som härstammar från gliomtumörer. Inom högst 10 minuter efter att GlioStem administrerats *in vitro*, i det befintliga mediet, kommer fluorescensemission att observeras utan någon modulering av cellerna eller tillsatts av ytterligare reagenser. Detektion observeras effektivt med fluorescensmikroskopi eller fluorescensassisterad cellsortering (FACS). GlioStem har testats i ett stort antal olika celltyper och specificiteten hos GlioStem för detektion av neurala stamceller och gliomstamceller *in vitro* har verifierats i cellinjer och primära celler från gnagare såväl som tumörvävnad från människor. Ingen sekundär detektionsmetod (t.ex. sekundära antikroppar eller enzymatisk reaktion) eller invasiv teknik krävs.

1.1 Reaktivitet

GlioStem-exponering resulterar i en cytoplasmisk självlysande signal som är tydligt detekterbar i Alexa488/GFP-våglängder i specifika celltyper. GlioStem har i tester visat positiv identifiering av embryonala kortikala stamceller från råttor (FGF2-expanderade), neurala stamceller med ursprung från embryonala stamceller från mus (FGF2/EGF-expanderade), FGF2-exponerade C6-glioma cellkulturer från råttor, hNES (human iPSC-derived neuroepithelial stem cells), progenitor-kulturer från humana glioblastomtumörer och färsk vävnad från humana gliom. I progenitor-kulturer från human glioblastom överlappar GlioStem till >90% med CD271 (p75) färgning i FACS-experiment.

1.2 Reagens

GlioStem levereras som 300 µg frystorkat pulver som ska lösas upp i 300 µl vatten av laboratoriumklass II. Produkten levereras i rumstemperatur (15 – 25°C), och ska förvaras enligt tabellen nedan omedelbart efter ankomst. Undvik att exponera produkten för ljus.

1.3 Förvaring och stabilitet

	Storlek	Förvaring	Hållbarhet
Frystorkat GlioStem	300 µg	Förvara vid 2 – 8°C	Stabil fram till utgångsdatumet på etiketten
Upplöst GlioStem	300 µl (1 µg/µl)	Förvara vid 2 – 8°C	Stabil i upp till 7 dagar i lösning

2. Användningsinstruktioner

Vänligen läs hela protokollet innan du fortsätter. Denna produkt ska endast hanteras av användare med laboratorieerfarenhet med kunskap inom fluorescensmikroskopi och/eller FACS.

2.1 Förberedelser

Den frystorkade produkten löses upp i 300 µl vatten av laboratoriumklass II för stamlösning.

1. Stick igenom gummitätningen med en spruta och nål som innehåller 300 µl laboratoriumklass II vatten.
2. Blanda väl med hjälp av vortex och låt stå i 1 minut i rumstemperatur (15 – 25°C). Se till att pulvret är helt upplöst.
3. Späd i lämpligt odlingsmedium eller PBS. Alternativt, tillsätt direkt till befintligt medium före användning. Spara eller återanvänd inte lösningen.

	Prov	Utspädning
Mikroskopi	Celler	1:500
	Vävnad	1:200
FACS	Celler	1:500
	Vävnad	1:500

För att uppnå bästa resultat rekommenderar vi att de optimala arbetsutspädningarna bestäms med titrering.

2.2 Mikroskopi av odlade celler

1. Kassera odlingsmediumet och skölj cellerna med sterilt PBS.
2. Addera medium till cellerna och tillsätt sedan GlioStem direkt i mediumet. Alternativt, addera medium med redan tillsatt GlioStem.
3. Virvla odlingsplattan och inkubera i cirka 5 minuter i rumstemperatur.
4. Detektera i ett fluorescensmikroskop vid Alexa488/GFP-våglängder.

2.3 Mikroskopi av vävnad

1. Förbered GlioStem i arbetslösning i en vial enligt tabellen ovan. Medium eller PBS kan användas.
2. Lägg små vävnadsbiopsier direkt i GlioStem-lösningen.
3. Inkubera i 5 minuter i rumstemperatur. Knäpp försiktigt på vialen var 30:e sekund för optimal infärgning av vävnadsbitar.
4. Lägg biopsierna på ett objektglas. Lägg på ett täckglas. Inget monteringsmedium är nödvändigt.
5. Detektera i ett fluorescensmikroskop vid Alexa488/GFP-våglängder. Färgningen ska visa ett högt signal-brusförhållande och vara övervägande cytoplasmiskt.

2.4 FACS av odlade celler

1. Kassera odlingsmediet och skölj cellerna med sterilt PBS.
2. Addera medium till cellerna och tillsätt sedan GlioStem direkt i mediumet. Alternativt, addera medium med redan tillsatt GlioStem.
3. Virvla odlingsplattan och inkubera i cirka 5 minuter i rumstemperatur.
4. Lossa cellerna försiktigt från plattan med en mild metod så att cellytan bevaras intakt.
5. Detektera GlioStem på en flödescytometer omedelbart med Alexa488/FITC-filter.







2.5 FACS av vävnad




Alla steg utförs i rumstemperatur tills färgning med FACS-antikroppar.



1. Mal vävnaden med en skalpell nr 10 i uppsamlingsmedium.
2. Addera 5 ml lämplig enzym-cocktail (beroende på vävnad).
3. Inkubera under rotation i 60 minuter vid 37°C.
4. Passera vävnad-enzymblandning genom en 70 µm nylonsil.
5. Centrifugera vid 350 g i 7 minuter.
6. Tvätta två gånger med HBSS (för att ta bort alla enzymer).
7. Lysera röda blodkroppar (om nödvändigt) med 1X lyseringsbuffert för röda blodkroppar.
8. Låt stå i 10 minuter vid rumstemperatur.
9. Centrifugera vid 350 g i 7 minuter. Förbered under tiden percoll-gradienter (om nödvändigt, för att ta bort myelin eller fettceller).
10. Återsuspendera celler i 500 µl 1x HBSS.
11. Lägg varsamt ett lager celler som är återsuspenderade i HBSS över percollgradienter i ett 15 ml rör.
12. Centrifugera celler med lämplig tid och kraft beroende på vävnad och percollgradienter. Se till att ändra accelerationen till 4 och bromsen till 0 på centrifugen.
13. Ta bort cellerna från lämpligt lager och addera 10 ml HSBSS för att tvätta bort återstående percoll från cellerna.
14. Centrifugera vid 350 g i 7 minuter.
15. Återsuspendera ofärgad kontroll i FACS-buffert (PBS innehållande 2.5% BSA och 5 µM EDTA) och det återstående provet i 500 µl blandning innehållande antikroppar av intresse.
16. Inkubera celler på is i 15 minuter.
17. Addera 5 ml FACS-buffert och centrifugera vid 350 g i 5 minuter.
18. Gå omedelbart till flödescytometern. Tillsätt DAPI vid lämplig koncentration för att bedöma celldöd.
19. Låt provet stå i rumstemperatur i cirka 10 minuter.
20. Tillsätt GlioStem (1:500) i 5 minuter.
21. Analysera cellerna på en flödescytometer.
22. Detektera GlioStem med Alexa 488/GFP/FITC filter.

3. Rekommendationer

- GlioStem fungerar bara i levande celler eller vävnader som har intakta cellmembran.
- Användning av GlioStem i heterogena tumörvävnadsprover kan förbättras med hjälp av myelinavlägsnande kit och percoll för avlägsnande av röda blodkroppar.
- Byt till medium utan fenolrött innan FACS-sortering av celler för att eliminera bakgrundssignaler.
- Vänta inte längre än 10 minuter med att starta mikroskopering eller FACS av GlioStem-färgat prov. Bakgrundsnivåer kan öka med längre exponering.
- Använd inte höga exponeringstider i mikroskopet eftersom skadade cellmembran leder till ökad bakgrund.
- Optimal inkuberingstid kan variera mellan celltyper.
- GlioStem kan användas tillsammans med DAPI för mikroskopi.
- GlioStem kan användas tillsammans med andra ytmarkörer för FACS.
- Produkten ska kasseras i enlighet med lokala föreskrifter för kemiskt avfall (oanvänd produkt) och biologiskt avfall (använd produkt).
- Produkten får inte återförsäljas.
- Kontakta Celluminova för säkerhetsdatablad gällande riskinformation och säker hantering.

 Tillverkare  Tillverkningsdatum  Använd före datum  Batchnummer  Katalognummer  Icke-steril

 Använd inte om produkten är skadad  Förvaras åtskilt från ljus  Temperaturgrens  Se bruksanvisning

 Medicinskt teknisk utrustning för in vitro-diagnostik  CE-certifierad