

## 各种动物骨髓单个核细胞分离液试剂盒

规格：3×200 mL/kit

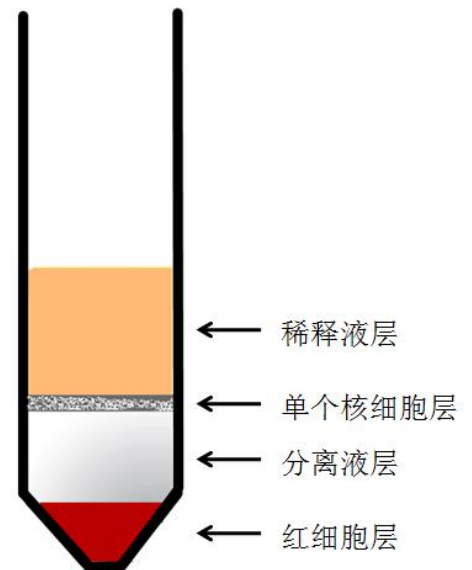
保存：本产品对光敏感，应该室温避光储存，保质期2年。无菌开封后，保存于室温。

组成：

各种动物骨髓单个核细胞分离液	200mL
全血及组织稀释液	200mL
细胞洗涤液	200mL

### 单个核细胞分离方法

1. 制备骨髓的单细胞悬液。
2. 取一支适当的离心管，加入与骨髓单细胞悬液等量的分离液（分离液最少不得少于3 mL，总体积不能超过离心管的三分之二，否则会影响分离效果）。
3. 小心吸取单细胞悬液加于分离液液面上，注意保持两液面界面清晰。（可以使用巴氏德吸管吸取单细胞悬液，然后小心的平铺于分离液上，因为两者的密度差异，将形成明显的分层界面。）
4. 室温，500~900g，离心20~30min。（根据骨髓单细胞悬液量确定离心条件，单细胞悬液量越大，离心力越大，离心时间越长，具体离心条件可以自行摸索，以达到最佳分离效果）。
5. 离心后，此时离心管中由上至下细胞分四层。第一层为稀释液层；第二层为环状乳白色单个核细胞层；第三层为透明分离液层；第四层为红细胞层。
6. 用吸管小心吸取第二层环状乳白色单个核细胞层至另一洁净的15mL离心管中，向离心管中加入10ml细胞洗涤液洗涤白膜层细胞，250g，离心10min。
7. 弃上清，5mL的PBS或细胞清洗液重悬细胞，250g，离心10min。
8. 重复步骤7
9. 弃上清，细胞重悬备用。



分层示意图

### 骨髓单细胞悬液的制备方法

小动物骨髓的采集：

1. 处死动物，无菌提取股骨和胫骨，剪去两端软骨，露出红色的骨髓腔（注意尽可能少的剪走骨髓腔）。
2. 取1ml的无菌注射器，吸取少量的含有10%标准胎牛血清的稀释液或者是含有血清的培养基，冲洗骨髓腔以获得骨髓。
3. 最终制备成 $2 \times 10^8 - 1 \times 10^9/\text{ml}$  的单细胞悬液备用。

大动物骨髓的采集：

大动物骨髓的采集可采取活体穿刺方法：先将动物麻醉、固定、局部除毛、消毒皮肤，然后估计好皮肤到骨髓的距离，把骨髓穿刺针的长度固定好。操作人员用左手把穿刺点周围的皮肤绷紧，右手将穿刺针在穿刺点垂直刺入，轻轻左右旋转将穿刺针钻入，当穿刺针进入骨髓腔时常有落空感。连接注射器缓慢抽吸骨髓组织，当注射器内抽到少许骨髓时即停止抽吸。用含10%标准胎牛血清的稀释液调整细胞浓度为 $2 \times 10^8 - 1 \times 10^9$ /ml 的单细胞悬液备用。

常用的骨髓穿刺点：

股骨：穿刺部位在股骨内侧面，靠下端的凹面处；

胸骨：穿刺部位是胸骨体与胸骨柄连接处；

肋骨：穿刺部位是第5~7肋骨各点的中点；

胫骨：穿刺部位是股骨内侧、靠下端的凹面处。如果穿刺采用的是肋骨，穿刺结束后要用胶布封贴穿刺孔，防止发生气胸。

### 注意事项：

- A. 开封前颠倒混匀，本分离液为无菌产品，为延长分离液保存时间，请在无菌条件下启封，避免微生物污染。
- B. 分离液使用时应始终保持室温（18℃~25℃），如室内温度较低，可将分离液预热。4℃或者是温度较低条件下离心，可能会导致白膜层中红细胞污染加重。
- C. 待分离的组织要求新鲜，避免冷冻和冷藏。
- D. 部分塑料制品（如聚苯乙烯）因其带有的静电作用，可能会导致细胞挂壁影响分离效果。
- E. 如果要进一步对分离的细胞进行培养，那在制备单细胞悬液和分离过程中，注意无菌操作，避免微生物污染。

### 参考文献：

1. Boyum A. Separation of leucocytes from blood and bone marrow. Scand J Clin Lab Invest Suppl. 1968; 97: 7.
2. Ting A, Morris PJ. A technique for lymphocyte preparation from stored heparinized blood. Vox Sang. 1971 Jun; 20(6): 561-3.
3. Boyum A. Separation of Blood Leucocytes, Granulocytes and Lymphocytes Tissue Antigens. 1974; 4(4): 269-74.
4. Weisbart RH, Webb WF, Bluestone R, Goldberg LS. A simplified method for lymphocyte separation. Vox Sang. 1972; 23(5): 478-80.