

各种动物脏器组织中性粒细胞分离液试剂盒

规格：200 mL/kit

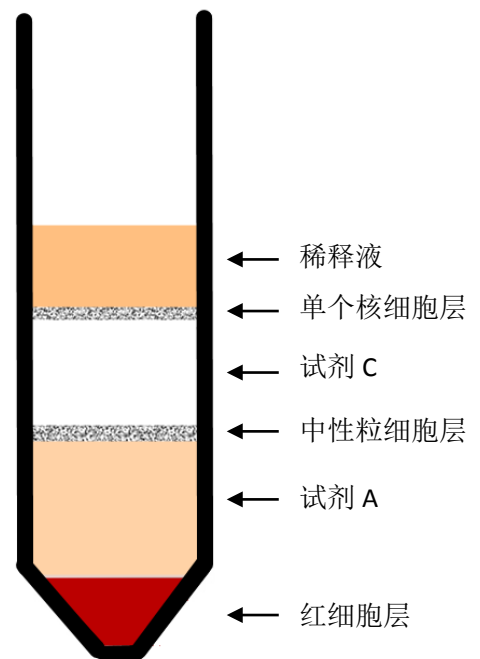
保存：本产品对光敏感，应该室温避光储存，保质期2年。无菌开封后，保存于室温。

试剂盒组成：

试剂A	200mL
试剂C	100mL
细胞洗涤液	200mL
全血及组织稀释液	200mL
红细胞裂解液	100mL

操作步骤（仅供参考）：

1. 制备脏器组织的单细胞悬液。
2. 细胞悬液体积小于5mL时，在离心管中先加入4mL试剂A，后将2mL试剂C小心叠加于试剂A之上，形成梯度界面（细胞悬液体积大于等于5mL，试剂A与试剂C比例2：1，试剂总量与稀释后的样本量相等。但二者的总体积不能超过离心管的三分之二，否则会影响分离效果），将细胞悬液平铺到分离液液面上方，注意保持两液面界面清晰。（可以使用巴氏德吸管吸取细胞悬液，然后将细胞悬液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。如果样品较多，加样的时间较长，在离心之前出现红细胞成团下沉属正常现象。）
3. 室温，水平转子500~1000g，离心20~30min（细胞悬液的体积越大所需的离心力越大，离心时间越长，最佳的分离条件需摸索，离心转速最大不超过1200g）。
4. 离心后，离心管中将出现两层环状乳白色细胞层，上层细胞为单个核细胞层，下层细胞为中性粒细胞层，如图所示（个体差异或者是分离条件不同，粒细胞层可分离不明显）。
5. 用吸管小心吸取试剂C与试剂A之间以及试剂A中的中性粒细胞到15mL洁净的离心管中，10mL PBS或细胞洗涤液洗涤细胞。250g，离心10min（如有红细胞混杂则加入适量红细胞裂解液）。
6. 弃上清，5mL的PBS或细胞清洗液重悬细胞，250g，离心10min。
7. 重复步骤6
8. 弃上清，细胞重悬备用。



分离示意图

脏器组织单细胞悬液的制备方法（仅供参考）

脏器组织研磨的方法：

1. 无菌条件下摘取脏器组织，撕去脏器被膜，用眼科剪将脏器组织剪成小块。
2. 将尼龙筛网或者是细胞过滤筛放置于平皿上，加入少量全血及组织稀释液（保证脏器组织及获得的细胞处于液体环境中）。
3. 将脏器组织放置于筛网上，使用注射器活塞或者是无菌镊子来研磨脏器组织（尽量控制研磨力度，保持筛网悬空，避免在皿底上直接研磨而造成大批细胞死亡）

4. 研磨完全后使用全血及组织稀释液冲洗筛网，收集细胞悬液，再经滤网过滤。

注：

- A. 可用酶消化法，使用胶原酶对脏器组织组织进行消化，得到单细胞悬液。
- B. 如果最终得到的细胞需要培养，那全过程所需试剂与器材均要求无菌。
- C. 根据脏器组织的体积控制单细胞悬液的浓度在 $10^8\sim 10^9$ 个/mL。

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（ $18^{\circ}\text{C}\sim 25^{\circ}\text{C}$ ），如室内温度较低，可将分离液预热。 4°C 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. 洗涤细胞，不可使用含Ca、Mg离子的缓冲液及培养液，其成分会导致血细胞凝集，大大降低细胞得率及纯度。
- 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，那在收集血液和分离过程中，注意无菌操作，避免微生物污染。
- F. 不同动物血液在不同比重分离液中的细胞离散系数及细胞带电不同，用户在制定分离液时应提供所需分离液的比重、动物种属及被分离细胞的名称。

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.
- 5. Recalde HR. A simple method of obtaining monocytes in suspension. J Immunol Methods. 1984 Apr 13;69(1):71-7.
- 6. Bøyum A, Løvhaug D, Tresland L. Separation of leucocytes: improved cell purity by fine adjustments of gradient medium density and osmolality. Scand J Immunol. 1991 Dec; 34(6):697-712.
- 7. Harris R, Ukaejiofo EO. Tissue typing using a routine one-step lymphocyte separation procedure. Br J Haematol. 1970 Feb; 18(2):229-35.