

各种动物脾脏中性粒细胞分离液试剂盒

规格: 200 mL/kit

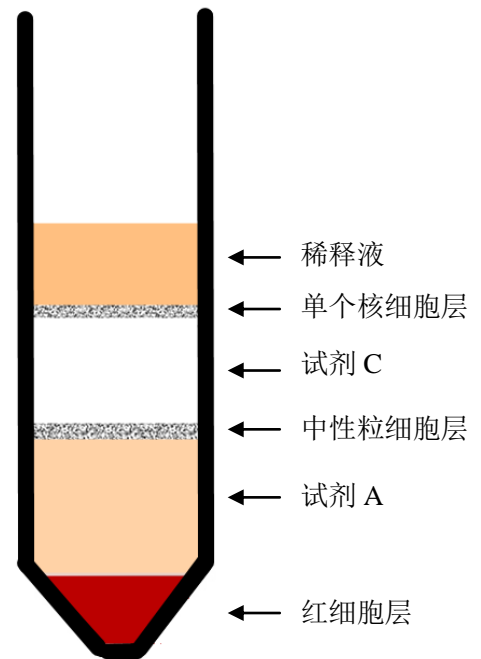
保存: 本产品对光敏感, 应该室温避光储存, 保质期 2 年。无菌开封后, 保存于室温。

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:

1. 制备脾脏的单细胞悬液。
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

脾脏单细胞悬液的制备方法

脾脏研磨的方法:

1. 无菌条件下摘取脾脏, 撕去脾脏被膜, 用眼科剪将脾脏剪成小块。
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(保证脾脏及获得的细胞处于液体环境中)。
3. 将脾脏放置于筛网上, 使用注射器活塞或者是无菌镊子来研磨脾脏(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，使用胶原酶对脾脏组织进行消化，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. 根据脾脏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.