

各种动物肿瘤浸润组织淋巴细胞分离液试剂盒

规格：3×200 mL/kit

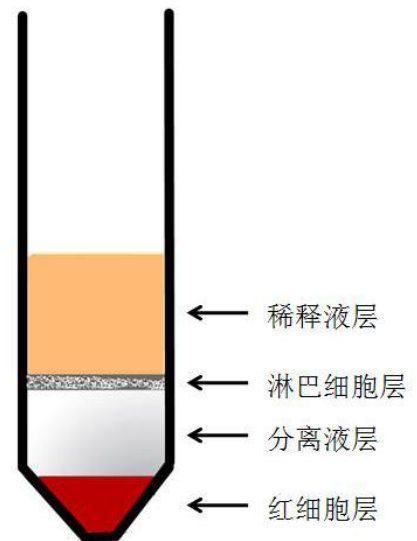
保存：本产品对光敏感，应该室温避光储存，保质期2年。无菌开封后，保存于室温。

组成：

各种动物肿瘤浸润组织淋巴细胞分离液	200mL
全血及组织稀释液	200mL
细胞洗涤液	200mL

淋巴细胞分离方法

1. 制备肿瘤浸润组织的单细胞悬液。
2. 取一支适当的离心管，加入与肿瘤浸润组织单细胞悬液等量的分离液（分离液最少不得少于3mL，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。（根据肿瘤浸润组织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淋巴细胞层；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淋巴细胞至另一洁净的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

肿瘤浸润组织单细胞悬液的制备方法

肿瘤浸润组织研磨的方法：

1. 无菌条件下摘取肿瘤浸润组织，用眼科剪将肿瘤浸润组织剪成小块。
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（保证肿瘤浸润组织及获得的细胞处于液体环境中）。
3. 将肿瘤浸润组织放置于筛网上，使用注射器活塞或者是无菌镊子来研磨肿瘤浸润组织（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, 使用胶原酶对肿瘤浸润组织组织进行消化, 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. 根据肿瘤浸润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. 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.
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.