

## 各种动物骨髓中性粒细胞分离液试剂盒

**规格:** 200 mL/kit

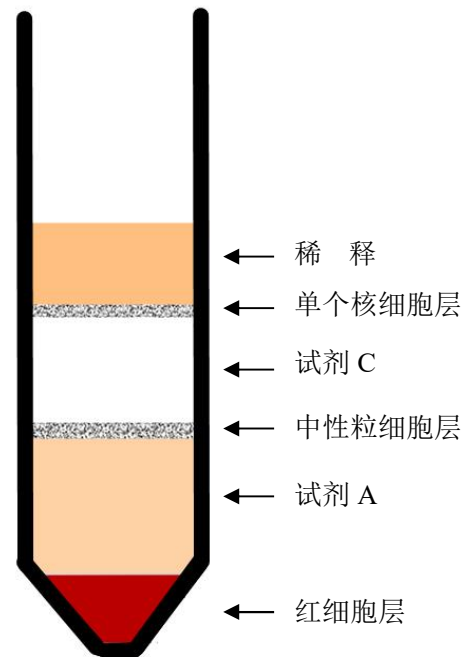
**保存:** 本产品对光敏感, 应该室温避光储存, 保质期 2 年。无菌开封后, 保存于室温。

### 试剂盒组成:

试剂盒组分	规格	保存条件
试剂 A	200mL	室温避光
试剂 C	100mL	室温避光
细胞洗涤液	200mL	室温
红细胞裂解液	100mL	室温
全血及组织稀释液	200mL	室温

### 操作步骤 (仅供参考):

1. 制备骨髓的单细胞悬液。
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

## 骨髓单细胞悬液的制备方法（仅供参考）

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或者是1XPBS稀释液，冲洗骨髓腔以获得骨髓。
3. 最终制备成 $2 \times 10^8 - 1 \times 10^9 / \text{ml}$  的骨髓单细胞悬液备用。

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 $2 \times 10^8 - 1 \times 10^9 / \text{ml}$  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（ $18^{\circ}\text{C} \sim 25^{\circ}\text{C}$ ），如室内温度较低，可将分离液预热。 $4^{\circ}\text{C}$ 或者是温度较低的条件离心，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.

**相关产品:**

<i>AC13980</i>	细胞洗涤液
<i>AC15774</i>	优级胎牛血清
<i>AC13979</i>	全血及组织稀释液
<i>AC10008</i>	<i>RPMI Medium 1640</i>
<i>AT1300</i>	胰蛋白酶— <i>EDTA</i> 消化液(0.25%)不含酚红
各种其他动物及其他细胞的分离液及试剂盒	