

各种动物骨髓中性粒细胞分离液试剂盒

注意：本产品试剂组分和操作步骤发生变化，使用前请仔细阅读说明书。

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：

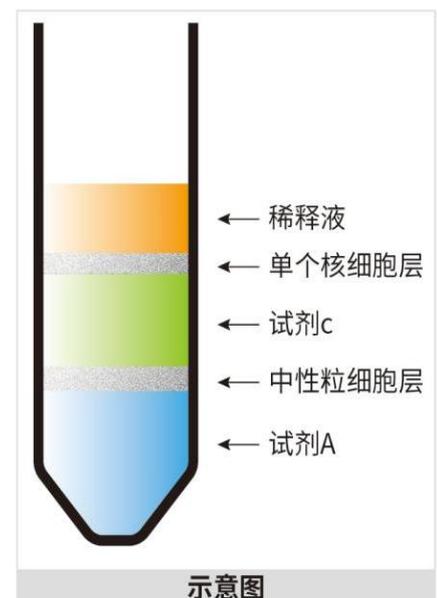
试剂A	200mL
试剂C	100mL
细胞洗涤液	200mL
全血及组织稀释液	200mL
红细胞裂解液	100mL

操作步骤一： 制备骨髓的单细胞悬液

操作步骤二： 样本分离（仅供参考）

1. 样本分离:当细胞悬液体积小于5mL时,先在离心管中先加入4mL试剂A,后将2mL试剂C小心叠加于试剂A之上,形成梯度面(样本体积大于等于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。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,注意保持两液界面清晰。(可以使用巴氏德吸管吸取细胞悬液,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于正常现象。)

2. 室温条件下水平转子500-1000g,20-30min(细胞悬液体积越大所需离心力越大,离心时间越长,最佳分离条件需摸索,离心最大转速不超过1200g)。



3. 离心后, 离心管中可见两个环状乳白色层, 上层为单个核细胞层, 下层即所需中性粒细胞层(受个体差异及分离条件影响, 粒细胞白膜层可能会出现颜色较浅的情况)。
4. 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)。
5. 弃上清, 加入 5mL 的PBS或细胞清洗液重悬细胞, 250g, 离心10min。
6. 重复步骤5。
7. 弃上清, 重悬细胞备用。

骨髓单细胞悬液制备:

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 $2 \times 10^8 - 1 \times 10^9$ /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: 穿刺部位是胫骨内侧、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°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. 稀释血液或洗涤细胞, 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，注意全程保持无菌操作，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。

相关产品：

AC13980 细胞洗涤液

AC13979 全血及组织稀释液

AC15774 优级胎牛血清

AC10008 RPMI Medium 1640

各种其他动物及其他细胞的分离液及试剂盒

注：有关使用本产品的文献请参考吉至官网。