

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

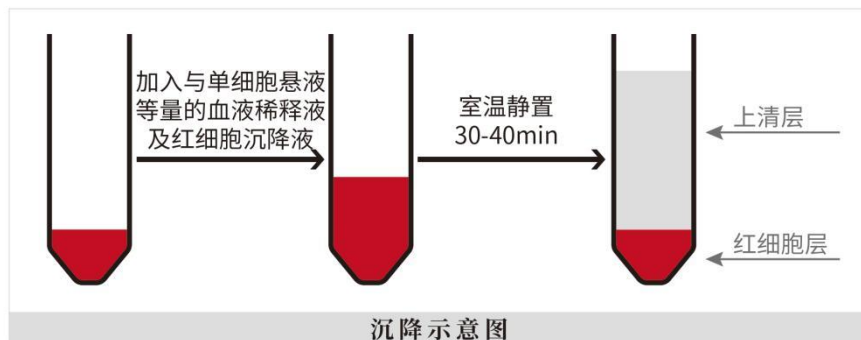
保存：本产品对光敏感，应该室温避光储存，保质期2年。无菌开封后，保存于室温。

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
红细胞沉降液	100mL	室温
细胞洗涤液	200mL	室温

操作步骤一：红细胞沉降（仅供参考）

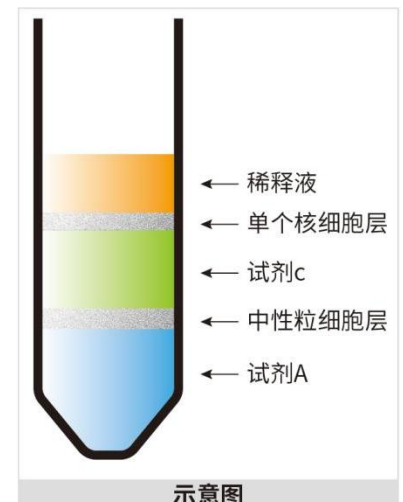
沉降去除红细胞：取骨髓单细胞悬液与血液稀释液(注射用生理盐水或1×PBS)及红细胞沉降液按照1:1:1比例混匀，室温下静置30-40min后，可见红细胞沉于试管底部，小心吸取上清层(富含白细胞及血小板)用于后续细胞分离。



操作步骤二：样本分离（仅供参考）

1. 样本分离:当样本体积小于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,形成梯度界面(样本体积大于等于5mL,试剂A与试剂C比例2:1,试剂总量等于沉降后样本含量),将悬液小心平铺于分离液液面上方。由于密度差异,可见明显的分层界面(注意二者的总体积不能超过离心管的三分之二,否则会影影响分离效果)。

2. 室温条件下水平转子600-1000g,25-30min(血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1000g)。



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. 用吸管吸取下层中性粒细胞白膜层至新的离心管中，加入 10mL 细胞清洗液洗涤细胞，250g，离心 10min。
5. 弃上清，加入 5mL 细胞清洗液重悬细胞，250g，离心 5min。
6. 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°C~25°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，可能会导致白膜层不清晰。
- C. 血液样本最好为新鲜抗凝血（采血 2h 以内），为保持中性粒细胞的活性，应避免冷冻和冷藏。
- D. 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。

- E. 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。
- F. 血液样本的粘稠度或者是温度差异，可能会影响分离效果，可以调节离心转数和离心时间，摸索最佳的分离条件。
- G. 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。
- H. 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：

YA0902 一次性巴氏德吸管

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