

## 各种动物脾脏单核细胞分离液试剂盒

**规格:** 200 mL/kit

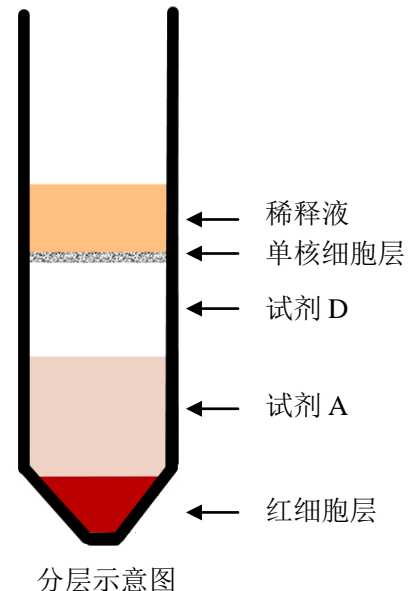
**保存:** 本产品对光敏感, 应该室温避光储存, 保质期 2 年。无菌开封后, 保存于室温。

### 试剂盒组成:

试剂A	200mL
试剂D	200mL
全血及组织稀释液	200mL
细胞洗涤液	200mL

### 操作步骤:

1. 制备脾脏的单细胞悬液。
2. 取一支无菌离心管, 先加入试剂A, 再加入试剂D, 使两者形成梯度界面 (试剂A: 试剂D的体积比为3: 2, 如细胞悬液的体积小于5ml, 则先后加入3ml试剂A和2ml试剂D; 如细胞悬液的体积大于5ml, 试剂总量与细胞悬液量相等), 两种试剂的分层一定要清晰。
3. 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, 水平转子500~800g, 离心20~30min (样本的体积越大所需的离心力越大, 离心时间越长, 最佳的分离条件需自行摸索, 离心转速最大不超过1000g)。
5. 离心后将出现明显的分层: 第一层为稀释液层; 第二层为白色单核细胞层; 第三层为透明试剂D液层; 第四层为半透明试剂A液层; 第五层为红细胞层 (如图示)。
6. 小心吸取第二层乳白色细胞层和第三层试剂D层到另一无菌的15ml离心管中, 加入10mL细胞洗涤液或PBS, 颠倒混匀, 250g, 离心10min。
7. 弃上清, 5mL的细胞清洗液或PBS重悬细胞, 250g, 离心10min。
8. 重复步骤7
9. 弃上清, 细胞重悬备用。
10. 差异贴壁法纯化细胞: 用单核细胞培养基以 $10^6$ 个/ml的密度重悬细胞, 将细胞铺于细胞板或细胞瓶中, 置于细胞培养箱中进行贴壁培养。
  - 1) 2~4 h内贴壁的为单核细胞。
  - 2) 10~24 h内贴壁的单个核细胞为内皮、内皮祖细胞、干细胞。
  - 3) 不贴壁的为淋巴细胞。



根据不同细胞的贴壁时间存在差异, 以达到简单纯化单核细胞的目的。此法成本低, 操作简便。如需获得高纯度的目的细胞则需选用免疫磁珠分选或者是应用流式技术分选细胞。

### 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。 $4^{\circ}\text{C}$ 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. 血液样本最好为新鲜的抗凝血（采血2 h以内），为保持单核细胞的活性，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. 吸取过多的单核细胞层及分离液层会导致分离液交界处的粒细胞被吸出从而使混杂的粒细胞数量增加；吸取过多的血浆层可能会导致单核细胞中血浆蛋白及血小板污染。
- H. 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。
- I. 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.