

动物脾脏组织 NK 细胞分离液试验方法

货号：AC13787

规格：2×200mL

保存：常温保存，有效期 2 年。本品易感染细菌，需无菌条件操作。无菌条件下操作，启封后置常温保存。如 4℃ 保存，本分离液易出现白色结晶，影响分离效果。

产品内容：

名称	规格
分离液 1	200ml
分离液 2	200ml

实验前准备：

1、适用仪器

最大离心力可达 1200g 的水平转子离心机

组织样本的制备：

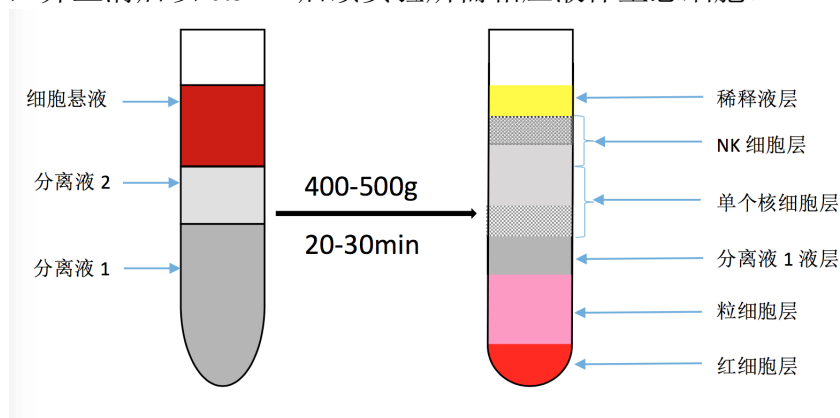
1. 取组织块称重后，用眼科剪刀无菌操作，将脾脏剪成小块。
2. 将组织块放在 70 μ m 细胞筛网上，用研磨器反复研磨，边研磨边加入匀浆冲洗液（以 0.1g 组织为例，约加 5-8ml），使细胞全部通过筛网滴到离心管中。
3. 弃去筛网，组织研磨液经 450g，离心 10min，弃上清。
4. 用样本稀释液重悬组织细胞，将细胞悬液细胞浓度调整为 2×10^8 — 1×10^9 /ml（以 0.1g 组织为例，约使用 1ml 样本稀释液重悬细胞），备用。

检验方法：

全过程样本、试剂及实验环境均需在 20 \pm 2℃ 的条件下进行。

1. 取一支离心管，依次小心加入分离液 1、分离液 2（体积比为 3:1，试剂总量与细胞悬液体积比为 2: 1。如细胞悬液为 2ml，则先后加入分离液 1: 3ml、分离液 2: 1ml。试剂总量最少不低于 4ml。），制成梯度界面，各液面分层一定要清晰。
2. 用吸管小心吸取细胞悬液加于分离液液面上，400-500g，离心 20-30min（注：根据样本量确定离心条件，血液样本量越多，离心力越大，离心时间越长，具体离心条件需客户自行摸索，以达到最佳分离效果）。
3. 离心后，此时离心管中由上至下分为六层。第一层为稀释液层。第二层为环状乳白色 NK 细胞层（第一层白环及上层 50%分离液 2）。第三层为环状乳白色单个核细胞层（下层 50%分离液 2 及第二层白环）。第四层为透明分离液 1 液层。第五层为粒细胞层。第六层为红细胞层。
4. 用吸管小心吸取第二层到另一 15ml 离心管中，往所得离心管中加入 5-10ml 洗涤液，混匀细胞。
5. 400g，离心 10min。

6. 弃上清。
7. 用吸管以 5-10ml 清洗液重悬所得细胞。
8. 250g，离心 10min。
9. 重复 7、8、9，弃上清后以 0.5ml 后续实验所需相应液体重悬细胞。



差异贴壁法纯化细胞：

(1) 用 NK 细胞无血清培养基或 NK 细胞完全培养基以 $1.5-3 \times 10^6$ 个/ml 的密度重悬细胞，将细胞铺于一次性细胞板或细胞瓶中，放于 37°C 二氧化碳培养箱中进行贴壁培养。

(2) 2-4 小时内贴壁的为巨噬细胞前体（俗称为单核细胞）。

(3) 10-24 小时内贴壁的单个核细胞为内皮、内皮祖细胞、干细胞。

(4) 不贴壁的为淋巴细胞。

注：a) 无血清培养基中不含任何动物成分，为得到更佳培养效果可添加 10% 自体血浆或 2-8% 的胎牛血清。

b) 完全培养基中含 2-20% 胎牛血清（血清具体含量由所培养的目的细胞而定）。

c) 由于每种细胞的贴壁时间存在差异可将所得细胞分开已达简单的纯化目的，此法成本相对较低。如需获得高纯度目的细胞则需在使用分离液后选用免疫磁珠阳性或阴性分选。

注意事项：

1. 全过程样本、试剂及实验环境均需在 $20 \pm 2^\circ\text{C}$ 的条件下进行。为获得最佳的实验结果，最好在取样 2h 内进行实验，样品存放时间越长，细胞分离效果越差。样品放置超过 6h 后分离效果更差甚至不能达到分离目的。

2. 本实验最好不要使用高聚合材质（如聚苯乙烯）的塑料制品，应使用无静电、低静电离心管及未经碱处理过后的玻璃制品，因为静电作用将导致细胞贴壁、碱处理的玻璃表面会变成毛面，影响细胞分离效果。

3. 吸取过多的目的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。

可能存在的问题及解决方法：

1. 由于血液粘度、细胞密度等差异可能造成的问题及解决方案如下表所示：

出现情况	出现原因	建议解决方案
离心后目的细胞存在于血浆层或稀释液层	转速过小或离心时间过短	适当增减转速
离心后目的细胞存在于分离液中	转速过大或离心时间过长	
离心后白环层弥散	细胞密度过大	调整细胞密度
离心后白环层太浅或看不见	细胞密度过小	

2. 本分离液分离细胞的原理为密度梯度离心，其密度与温度、大气压等密切相关。不同地区客户可根据当地情况对离心条件进行适当调整。建议对离心条件进行调整时，恒定离心时间，对离心转速进行调整。

3. 本分离液依照国际标准，全部使用药用级原料，性能指标与国产同类产品略有不同，可能出现红细胞沉降不完全的情况，可以适当加大离心转速。

注：在对离心条件进行调整时，离心转速的加减以50-100g 为基数，直至达到最佳分离效果，离心力最小不得小于400g，最大不得大于1200g。离心时间以20-30min 为准。