

各种动物骨髓白细胞分离液试剂盒

规格: 200 mL/kit

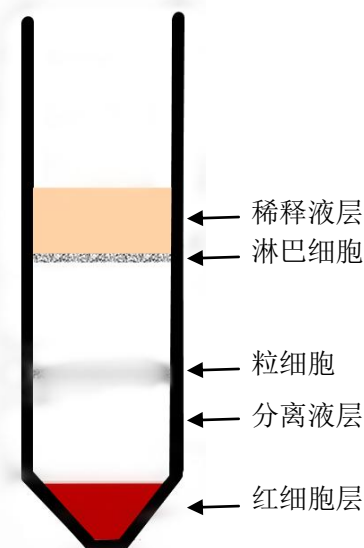
保存: 本产品对光敏感, 应该室温避光储存, 保质期 2 年。无菌开封后, 保存于室温。

试剂盒组成:

各种动物骨髓白细胞分离液	200mL
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:

1. 制备骨髓的单细胞悬液。
2. 在离心管中加入适量分离液(细胞悬液体积小于5mL时, 加入5mL分离液; 大于等于5mL, 加入等体积分离液。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. 离心后将出现明显的分层: 最上层是稀释的稀释液层; 稀释液与分离液之间是淋巴细胞层; 分离液中为粒细胞层(个体差异或者是分离条件不同, 粒细胞层可能分离不明显); 最下层为红细胞层。
5. 小心的吸取淋巴细胞层及分离液层细胞到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

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 $2 \times 10^8 - 1 \times 10^9/\text{ml}$ 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℃~25℃），如室内温度较低，可将分离液预热。4℃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. 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. 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。
- F. 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。
- G. 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：

R1018 细胞洗涤液

S9020 优级胎牛血清

R1017 全血及组织稀释液

31800 RPMI Medium 1640

T1300 胰蛋白酶 - EDTA消化液(0.25%)不含酚红

YA0902 一次性巴氏德吸管

各种其他动物及其他细胞的分离液及试剂盒