

各种动物脾脏中性粒细胞分离液试剂盒

规格: 200 mL/kit

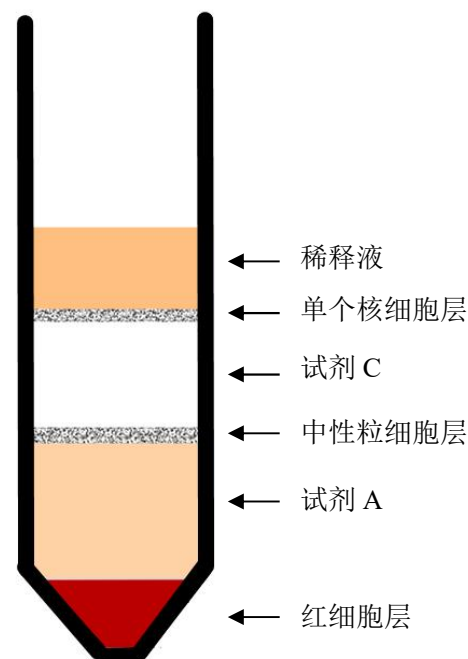
保存: 本产品对光敏感, 应该室温避光储存, 保质期 2 年。无菌开封后, 保存于室温。

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

操作步骤 (仅供参考):

1. 制备脾脏的单细胞悬液。
2. 细胞悬液体积小于5mL时, 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 (细胞悬液体积大于等于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等。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, 离心管中将出现两层环状乳白色细胞层, 上层细胞为单个核细胞层, 下层细胞为中性粒细胞层, 如图所示 (个体差异或者是分离条件不同, 粒细胞层可分离不明显)。
5. 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)。
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

脾脏单细胞悬液的制备方法 (仅供参考)

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°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. 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, 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。
- 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。

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.
6. Bøyum A, Løvhaug D, Tresland L. Separation of leucocytes: improved cell purity by fine adjustments of gradient medium density and osmolality. Scand J Immunol. 1991 Dec; 34(6):697-712.
7. Harris R, Ukaejiofo EO. Tissue typing using a routine one-step lymphocyte separation procedure. Br J Haematol. 1970 Feb; 18(2):229-35.

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