

各种动物肿瘤浸润组织淋巴细胞分离液试剂盒

规格：200 mL/kit

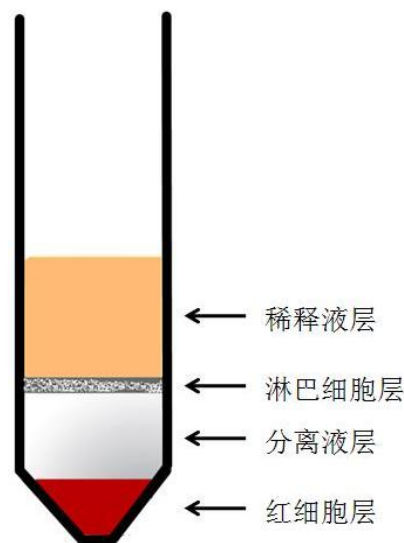
保存：本产品对光敏感，应该室温避光储存，保质期 2 年。无菌开封后，保存于室温。

试剂盒组成：

各种动物肿瘤浸润组织淋巴细胞分离液	200mL
全血及组织稀释液	200mL
细胞洗涤液	200mL

淋巴细胞分离方法

1. 制备肿瘤浸润组织的单细胞悬液。
2. 取一支适当的离心管，加入与肿瘤浸润组织单细胞悬液等量的分离液（分离液最少不得少于 3mL，总体积不能超过离心管的三分之二，否则会影响分离效果）。
3. 小心吸取单细胞悬液加于分离液液面上，注意保持两液面界面清晰。（可以使用巴氏德吸管吸取单细胞悬液，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，500~900g，离心20~30min。（根据肿瘤浸润组织单细胞悬液的量确定离心条件，单细胞悬液量越大，离心力越大，离心时间越长，具体离心条件可以自行摸索，以达到最佳分离效果）。
5. 离心后，此时离心管中由上至下细胞分四层。第一层为稀释液层；第二层为环状乳白色淋巴细胞层；第三层为透明分离液层；第四层为红细胞层。
6. 用吸管小心吸取第二层环状乳白色淋巴细胞至另一洁净的 15mL 离心管中，向离心管中加入 10ml 细胞洗涤液洗涤白膜层细胞，250g，离心 10min。
7. 弃上清，5mL 的 PBS 或细胞清洗液重悬细胞，250g，离心 10min。
8. 重复步骤 7
9. 弃上清，细胞重悬备用。



分层示意图

肿瘤浸润组织单细胞悬液的制备方法

肿瘤浸润组织研磨的方法：

1. 无菌条件下摘取肿瘤浸润组织，用眼科剪将肿瘤浸润组织剪成小块。
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（保证肿瘤浸润组织及获得的细胞处于液体环境中）。
3. 将肿瘤浸润组织放置于筛网上，使用注射器活塞或者是无菌镊子来研磨肿瘤浸润组织（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，使用胶原酶对肿瘤浸润组织组织进行消化，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. 根据肿瘤浸润组织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. 待分离的组织要求新鲜，避免冷冻和冷藏。

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，那在制备单细胞悬液和分离过程中，注意无菌操作，避免微生物污染。

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