

“XX”动物外周血中性粒细胞分离液 KIT 说明书

【产品规格】

200ml/Kit

【产品组成】

为方便广大用户使用，试剂内容如下：

	名称	产品编号	规格
A	分离液 1 (“XX”动物) 外周血中性粒分离液		200ml
B	分离液 2		100ml
C	清洗液 (赠品)	2010X1118	200ml
D	红细胞裂解液 (赠品)	NH4CL2009	100ml
E	说明书		1 份

【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。

(离心机使用时调整为慢升慢降(具体参数请咨询离心机厂家)建议升速(指开始启动→达到设定离心力)的时间、降速(指设定离心时间完成→机器完全停止)时间均控制在 3 分钟左右。)

2. 抗凝剂的选择

在动物实验采血时，很多实验者选择医用真空采血管获得抗凝血，医用采血管中的抗凝剂只考虑血浆质量，但不利于高纯度细胞分离实验(或必须使用枸橼酸钠的医用真空抗凝采血管)。

为此，天津灏洋特别开发出专用实验动物抗凝剂及抗凝管专用于细胞分离，改变使用普通采血管获得抗凝血分离效果不佳，提取率及纯度低下的不良结果。

序号	产品名称	产品货号	规格
1	TBD™ 细胞分离专用抗凝剂	TBDTM-0050	100ml
2		TBDTM-0200	200ml
3		TBDTM-0500	500ml
4	TBD™ 实验动物一次性使用负压采血管 (随试剂盒附赠 5 支)	TBDTM-0001	5ml/支

3. 无菌硅化离心管

序号	产品名称	产品货号	规格
1	无菌硅化离心管/10ml(随试剂盒附赠 5 支)	TUB2015	100 支/包

4. 目的细胞最佳分离时间

血液离体后 2 小时内。如达不到 2 小时内分血条件，请务必于 4 小时内进行分血步骤，超过 4 小时很难顺利进行分离。

血液离体时间	分离效果
2 小时内	最佳
2-4 小时	可接受
4-6 小时	细胞活性下降，分离效果不佳
6 小时以上	分离效果极差，直至分离不出细胞

5. 分离液的使用环境

- 分离液需常温（15℃-25℃）避光保存，严禁冷藏冷冻保存；
- 使用时严格遵守无菌操作规范（超净工作台或生物安全柜内），并在 18℃-22℃ 环境温度下进行操作，20℃ 条件下分离效果最佳。超出此温度范围，有可能使分离液密度发生改变，造成分离效果不佳。

6. 参考值（目的细胞参考范围）

本试剂盒可保证目的细胞的提取率大于 80%，不是纯度。如需获得高纯度目的细胞，请配合免疫磁珠分选。本试剂盒可减少磁珠的使用量，减少成本。

【检验方法】

全过程样本、试剂及实验环境均需在 20±2℃（试剂需要复温。夏季 20℃，冬季 25℃。）的条件下进行。

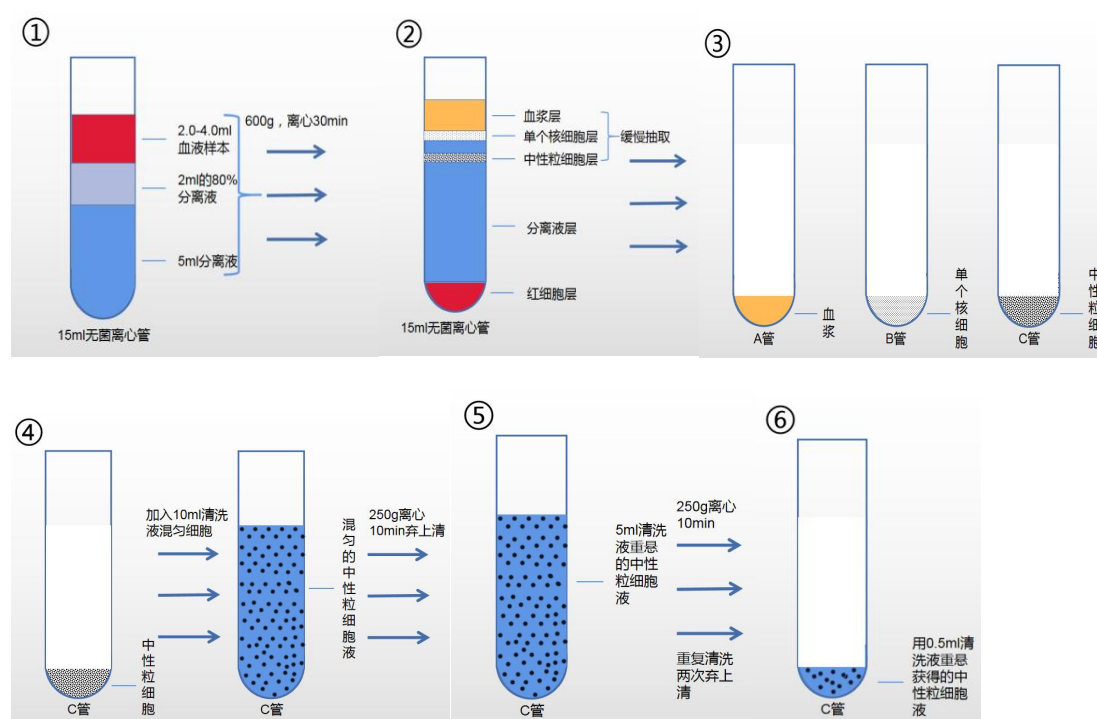
根据样本量大小，分以下两种情况：

情况 A：血液样本量小于 5ml 时，实验方法如下：

- 取一支 15ml 无菌离心管，先加入 5ml 分离液 1，后缓慢加入 2ml 分离液 2，形成梯度界面。再缓慢吸取 2-4ml 血液样本加于分离液液面之上（总液体量不得超过 2/3）。
- 以 600g，离心 30min（注：如改变血液样本及分离液用量，需相应调整离心力及离心时间。）
- 离心后，离心管中血浆层下将出现两层环状乳白色细胞层，上层细胞为（“XX”动物）单个核细胞层，下层细胞为（“XX”动物）中性粒细胞层。
- ①小心吸取血浆层转移到新离心管 A 中备用（分离效果不理想，可进行后续处理方案）
②小心吸取离心管中的单个核细胞层转移到新离心管 B 中。
③小心吸取离心管中的中性粒细胞层转移到新离心管 C 中。

- 向含有(“XX”动物)中性粒细胞离心管 C 中, 加入 10ml 清洗液(产品编号: 2010X1118), 混匀细胞。
- 250g, 离心 10min。弃去上清。
- 用吸管吸取 5ml 清洗液(产品编号: 2010X1118) 重悬所得细胞。
- 250g, 离心 10min, 弃去上清。
- 重复清洗两次, 弃去上清, 用 0.5ml 清洗液(产品编号: 2010X1118) 或根据下一步实验要求加入相对应液体, 重悬所得细胞。

分离图例

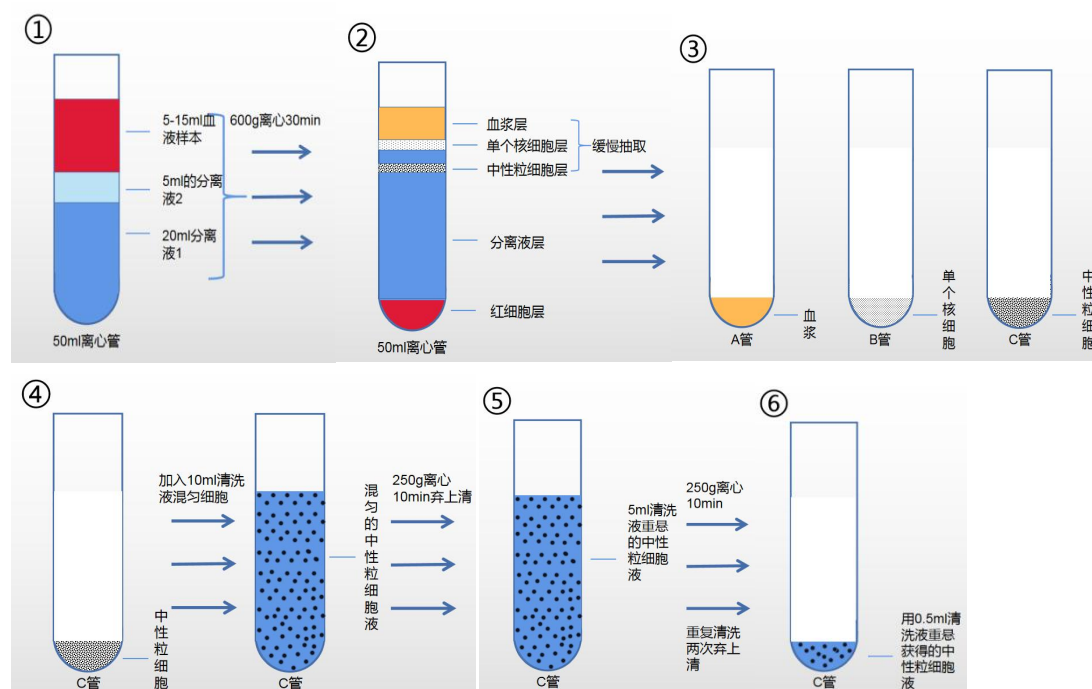


情况 B: 血液样本量大于等于 5ml 时, 实验方法如下:

- 取 50ml 的无菌离心管, 小心加入 20ml 分离液 1, 后缓慢加入 5ml 分离液 2, 形成梯度界面。再缓慢吸取 5-15ml 血液样本加于分离液液面之上(总液体量不得超过 2/3)。
- 以 600g, 离心 30min。(注: 根据血液样本量确定离心条件, 血液量越多, 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。)
- 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(“XX”动物)单个核细胞层, 下层细胞为(“XX”动物)中性粒细胞层。
- ①小心吸取血浆层转移到新离心管 A 中备用(分离效果不理想, 可进行后续处理方案)。
②小心吸取离心管中的单个核细胞层转移到新离心管 B 中。
③小心吸取离心管中的中性粒细胞层转移到新离心管 C 中。

5. 向含有(“XX”动物)中性粒细胞离心管 C 中,加入 10ml 清洗液(产品编号: 2010X1118),混匀细胞。
6. 250g, 离心 10min。弃去上清。
7. 用吸管吸取 5ml 清洗液(产品编号: 2010X1118)重悬所得细胞。
8. 250g, 离心 10min, 弃去上清。
9. 重复清洗两次, 弃去上清, 用 0.5ml 清洗液(产品编号: 2010X1118) 或根据下一步实验要求加入相对应液体, 重悬所得细胞。

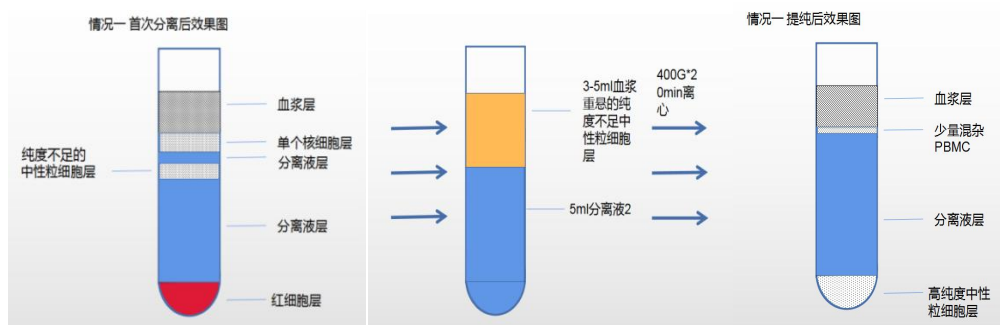
分离图例



【分离过程中可能出现的情况及处理方案】

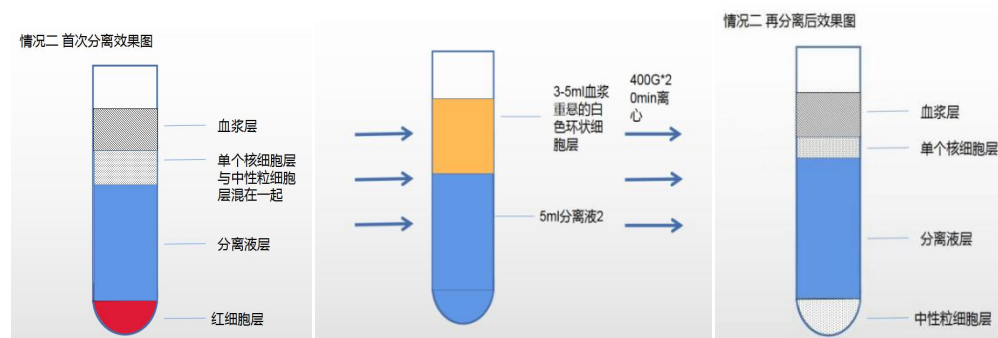
情况一：可见单个核细胞层和中性粒细胞层两层细胞（如果中性粒细胞纯度<70%提纯方法如此步骤）

1. 取中性粒细胞层, 清洗后用备用的血浆 3-5ml 重悬细胞。
2. 使用本试剂盒中的分离液 2 提纯。
 - a. 取 15ml 离心管, 加入 5ml 分离液 2, 将用血浆重悬的 3-5ml 中性粒细胞层细胞缓慢加于分离液之液面上, 400g, 离心 20min。
 - b. 离心后, 离心管底部细胞即为高纯度中性粒细胞, 纯度可达 90%以上。
 - c. 可重复检验方法中的目的细胞洗涤方法, 获得高纯度中性粒细胞。



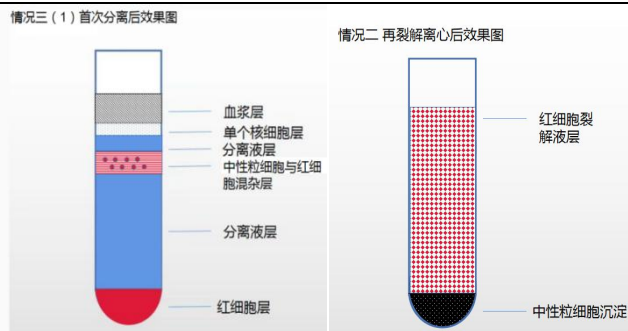
情况二：单个核细胞层和中性粒细胞层混在一起不能分开

1. 吸取全部白色环状细胞层，清洗后用备用的血浆 3-5ml 重悬细胞。
2. 使用本试剂盒中的分离液 2，重新提取中性粒细胞。
 - a. 取 15ml 离心管，加入 5ml 分离液 2，将用血浆重悬的 3-5ml 白环层细胞缓慢加于分离液之液面上，400g，离心 20min。
 - b. 离心后，离心管底部细胞即为中性粒细胞。
 - c. 可重复检验方法中的目的细胞洗涤方法，获得中性粒细胞。



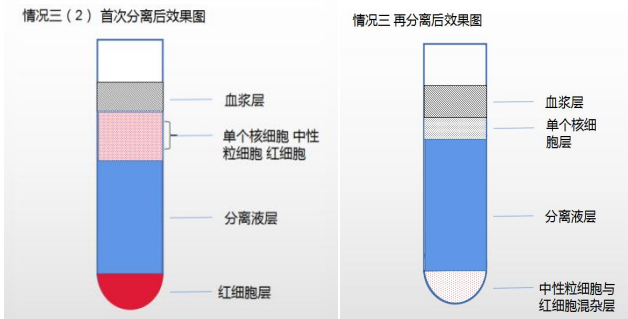
情况三(1)：中性粒细胞层混杂红细胞

1. 吸取有红细胞混杂的中性粒细胞层。
 2. 取 15 毫升离心管加入红细胞混杂的中性粒细胞层，根据红细胞残余数量酌情加入 5-8 倍红细胞裂解液。
 3. 如有红细胞混杂则加入适量红细胞裂解液（产品编号：NH4CL2009）将红细胞裂解（具体方法见“红细胞裂解液使用说明”）即得目的细胞。
- 参考红细胞裂解液说明书（附后）操作。少时多次裂解后获得中性粒细胞。



情况三(2)单个核细胞、中性粒细胞、红细胞，三种细胞完全混杂

1. 吸取混杂层，清洗后用备用的血浆 3-5ml 重悬细胞。
2. 使用本试剂盒中的分离液 2，重新提取红细胞与中性粒细胞混杂层。
 - a. 取 15ml 离心管，加入 5ml 分离液 2，将用血浆重悬的 3-5ml 中性粒细胞与红细胞混杂层缓慢加于分离液之液面上，400g，离心 20min。
 - b. 离心后，离心管底部细胞即为中性粒细胞与红细胞混杂层。
3. 取 15 毫升离心管加入红细胞混杂的中性粒细胞层，根据红细胞残余数量酌情加入 5-8 倍红细胞裂解液。
 - a. 参考红细胞裂解液说明书（附后）操作，少时多次裂解后获得中性粒细胞。



【注意事项】

1. 全过程样本、试剂及实验环境均需在 $20 \pm 2^\circ\text{C}$ （夏季 20°C ，冬季 $22-25^\circ\text{C}$ ）的条件下进行。为获得最佳的实验结果，最好在取血 2h 内进行实验，血液存放时间越长，细胞分离效果越差。血液放置超过 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. 分离液用量大于血液样本时，分离效果更佳。
4. 血液样本不需稀释，直接进行分离即可。

-
5. 如分离的目的细胞是中性粒细胞，则抗凝血制备时，抗凝剂用量要是适量增加。
 6. 如实验后细胞得率或活性过低，请联系技术支持以寻求帮助。

【储存条件及有效期】

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。

【参考值（参考范围）】

本实验中中性粒细胞提取率大于80%。

【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. 离心力公式及单位换算

<http://www.shanjin.com.cn/news/23.html>

3. 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。
4. 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。

扫码观看教学视频



“XX” 动物外周血中性粒细胞的
分离教学视频



两种分离液叠加视频教学