

## 大(小)鼠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
<b>A</b>	分离液 1（大/小鼠外周血中性粒分离液）		200ml
<b>B</b>	样本稀释液	2010C1119	200ml
<b>C</b>	清洗液（赠品）	2010X1118	200ml
<b>D</b>	红细胞裂解液（赠品）	NH4CL2009	100ml
<b>E</b>	红细胞沉降液（6%羟乙基淀粉）（赠品）	HES-TBD550-80	80ml
<b>F</b>	细胞分离专用抗凝剂（赠品）	TBDTM-0050	100ml
<b>G</b>	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（随试剂盒 附赠 100ml 装：1 瓶）	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	TBDTM-0001	5ml/支

### 3. 无菌硅化离心管(少量血液样本专用离心管)

序号	产品名称	产品货号	规格
1	无菌玻璃离心管/5mL(随试剂盒附赠 5 支)	TUB2016	100 支/包
2	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。

制备抗凝血液，抗凝剂与全血体积比为 1:1。

(注：抗凝剂使用比例不宜过低，否则影响分离效果)

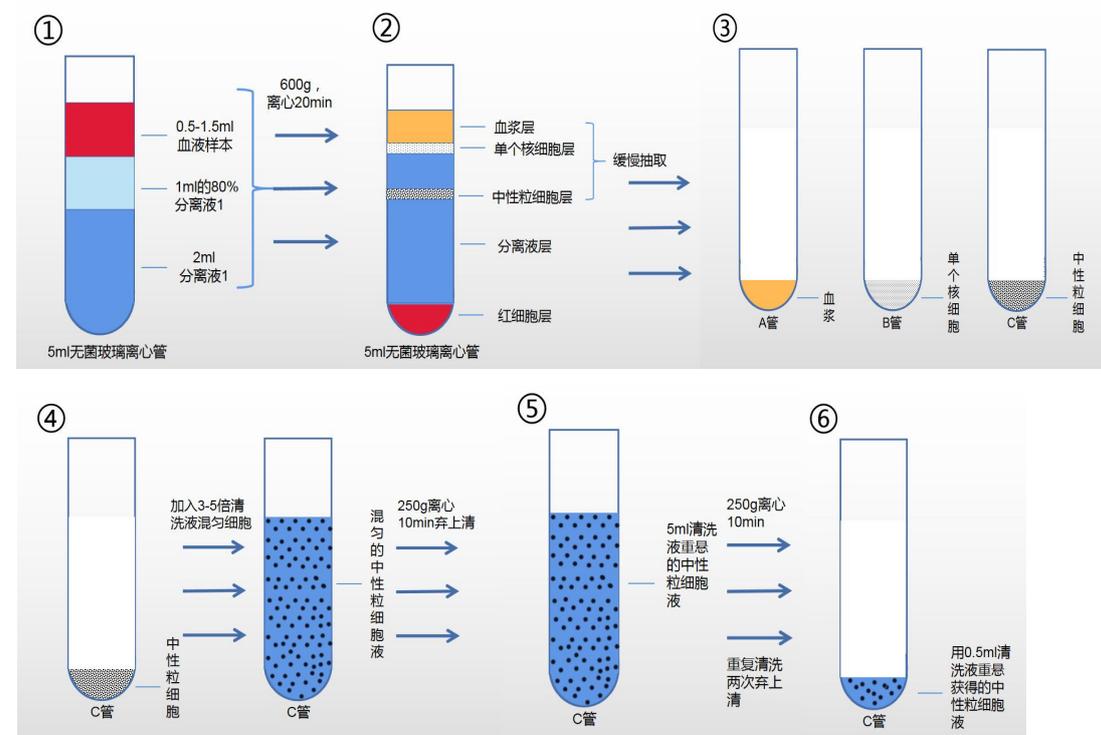


## 根据样本量大小，分以下两种情况：

### 情况A：血液样本量0.5-1.0ml时，实验方法如下：

1. 取一支 5ml 无菌玻璃离心管 (TUB: 2016)，加入 2ml 分离液 1，后缓慢加入 1ml 的 80% 浓度的分离液溶液(分离液 1：样本稀释液=4：1 的混合液)，形成梯度界面。
2. 制备血液样本：抗凝血液与红细胞沉降液按 2：1 比例混匀后，小心加于分离液梯度界面之上，600g，离心 20min (使用 5ml 无菌玻璃离心管，可能需要使用 50ml 的 PBMC 高效离心管)。
3. 离心后，离心管中的血浆层下面将出现两层环状乳白色细胞层，上层细胞为 (大/小鼠) 单个核细胞层，下层细胞为 (大/小鼠) 中性粒细胞层。
4. 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. 向含有中性粒细胞离心管 C 中，加入 3-5 倍体积清洗液 (产品编号：2010X1118)，混匀细胞后，250g，离心 10min，弃去上清。
6. 用吸管吸取 5ml 清洗液 (产品编号：2010X1118) 重悬所获得的细胞，250g，离心 10min，弃去上清。
7. 重复清洗两次，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。

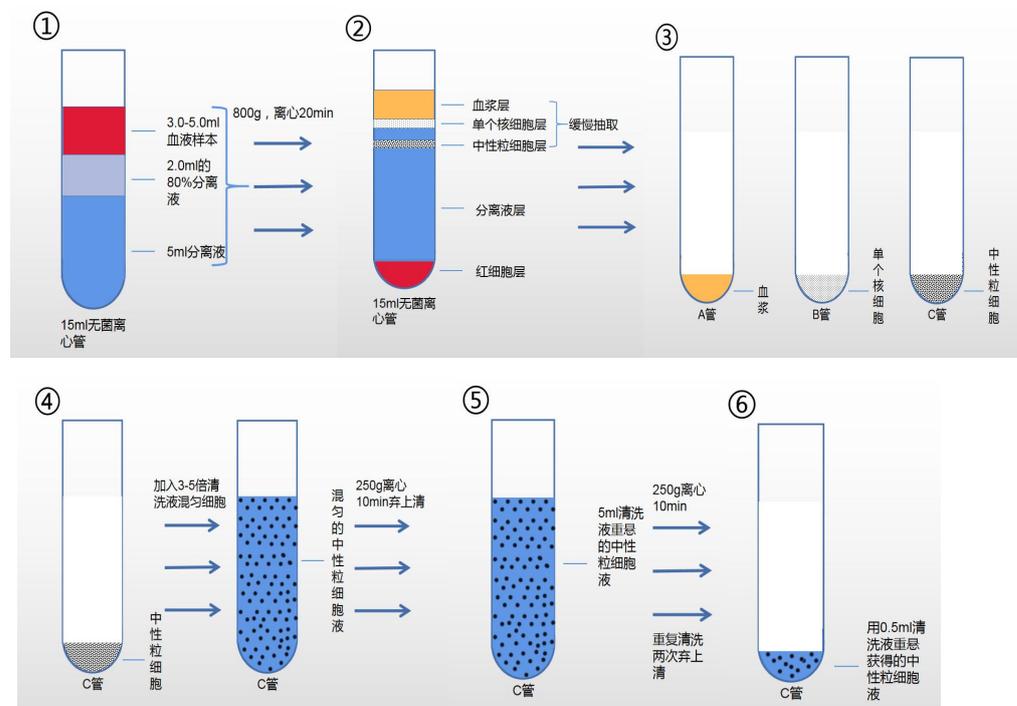
### 分离图例



**情况B：血液样本量1.0-2.0ml时，实验方法如下：**

1. 取一支 15ml 无菌离心管，加入 5ml 分离液 1，后缓慢加入 2.0ml 的 80%浓度的分离液溶液(分离液 1：样本稀释液=4：1 的混合液)，形成梯度界面。  
或（取一支 10ml 无菌硅化离心管（TUB：2015），加入 3ml 分离液 1，后缓慢加入 2ml 的 80%浓度的分离液溶液(分离液 1：样本稀释液=4：1 的混合液)，形成梯度界面。）
2. 制备血液样本：抗凝血液与红细胞沉降液按 2：1 比例混匀后，小心加于分离液梯度界面之上（分离液加入量不得少于血液样本加入量，血液样本较多时按比例增加分离液和分离液溶液，并更换合适离心管），800g，离心 20min。
3. 离心后，离心管中的血浆层下面将出现两层环状乳白色细胞层，上层细胞为（大/小鼠）单个核细胞层，下层细胞为（大/小鼠）中性粒细胞层。
4. 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. 向含有中性粒细胞离心管 C 中，加入 3-5 倍体积清洗液（产品编号：2010X1118），混匀细胞后，250g，离心 10min，弃去上清。
6. 用吸管吸取 5ml 清洗液（产品编号：2010X1118）重悬所收集的细胞，250g，离心 10min，弃去上清。
7. 重复清洗两次，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。

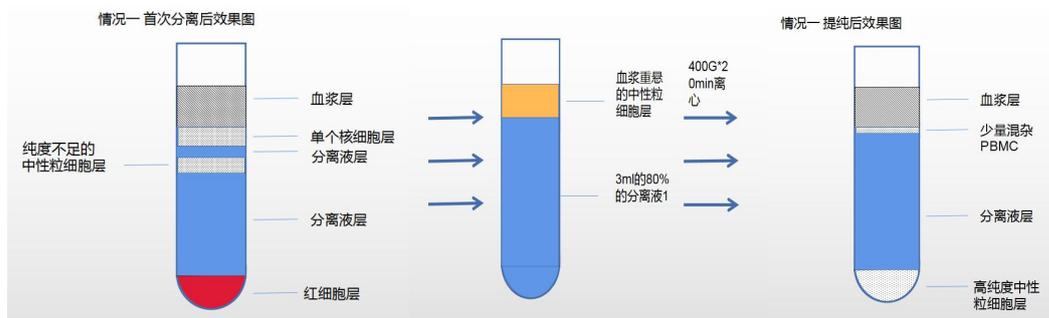
**分离图例**



### 【分离过程中可能出现的情况及处理方案】

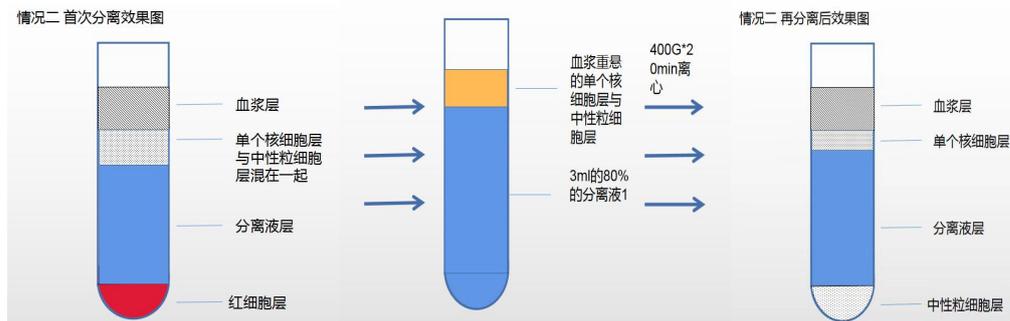
情况一：可见单个核细胞层和中性粒细胞层两层细胞（如果中性粒细胞纯度<70%提纯方法如此步骤）

1. 取中性粒细胞层，清洗后用备用的血浆1-2ml重悬细胞。
2. 使用分离液1提纯（80%浓度的分离液1(分离液1：样本稀释液=4：1的混合液)）。
  - a. 取10ml无菌硅化离心管，加入3ml的80%分离液1，将用血浆重悬的1-2ml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。



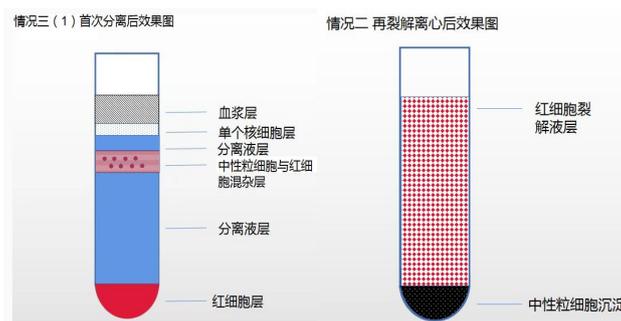
情况二：单个核细胞层和中性粒细胞层混在一起不能分开

1. 吸取全部白色环状细胞层，清洗后用备用的血浆1-2ml重悬细胞。
2. 使用分离液1提纯（80%浓度的分离液1(分离液1：样本稀释液=4：1的混合液)）。
  - a. 取10ml无菌硅化离心管，加入3ml的80%分离液1，将用血浆重悬的1-2ml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。



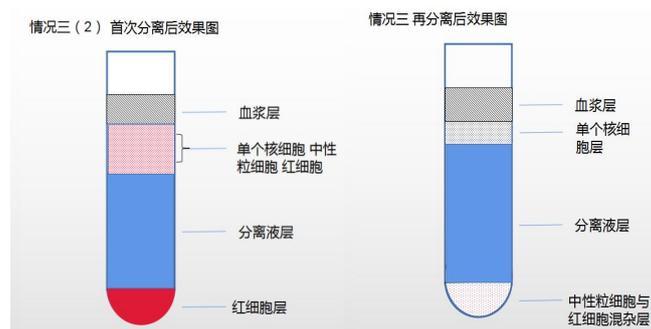
### 情况三(1): 中性粒细胞层混杂红细胞

1. 吸取有红细胞混杂的中性粒细胞层。
  2. 取10ml无菌硅化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. 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1-2ml重悬细胞。
  2. 使用使用分离液1(80%浓度的分离液溶液(分离液1: 样本稀释液=4: 1的混合液)),重新提取红细胞与中性粒细胞混杂层。
    - a. 取10ml离心管,加入3ml的80%分离液1,将用血浆重悬的1-2ml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10ml无菌硅化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。
- 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  $20^{\circ}\text{C}$ , 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. 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。
5. 请勿使用具有红细胞保护成分的抗凝剂,否则影响分离效果(离心后,红细胞不能完全沉至离心管底部)。
6. 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。

**【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%。

下表为大(小)鼠外周血中各种细胞的数量及比例,用户可适当进行参考(参考百度文库)。

	红细胞	白细胞			血小板
含量(个/ $\mu\text{L}$ )	$(10.6\pm 0.4)\times 10^3$	$(2.6\pm 0.9)\times 10^3$			$(1157\pm 123)\times 10^3$
		中性粒细胞	淋巴细胞	单核细胞	
		20%-30%	50%-70%	3%-8%	

**【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



大（小）鼠外周血中性粒细胞分离教学视频



两种分离液叠加视频教学