



细胞分选/富集试剂盒说明书合集

www.tbdscience.com

天津市灏洋生物制品科技有限责任公司

天津灏洋华海生物科技有限公司

人外周血中性粒细胞分离液 KIT 说明书

血液样本选择

每个人都是一个单独个体，血液样本也有差异。例如：疾病、药物、性别、身体状况、经期等等。

有些病人血液样本可能出现分离效果较差（部分女性分离不好），目前原因不明确。

预实验标准选择成年健康男性样本。

【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（人外周血中性粒分离液）		200ml
B	清洗液（赠品）	2010X1118	2×200ml
C	红细胞裂解液（赠品）	NH4CL2009	100ml
D	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

天津市灏洋生物制品科技有限责任公司 天津灏洋华海生物科技有限公司 - 1 -

天津滨海新区华苑产业区（环外）海泰华科一路 15 号润丰科技 3 幢 5 层

技术服务 Tel: 15822121119 15822691119 13920701119 ◆ Fax: 022-58921250 ◆ QQ: 2768676807

www.tbdscience.com ◆ E-mail: tbd15822121119@163.com

灏洋生物 TBDsciences



细胞分选/富集试剂盒说明书合集

www.tbdscience.com

天津市灏洋生物制品科技有限责任公司

天津灏洋华海生物科技有限公司

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 23℃。）的条件下进行。

根据样本量大小，分以下两种情况：

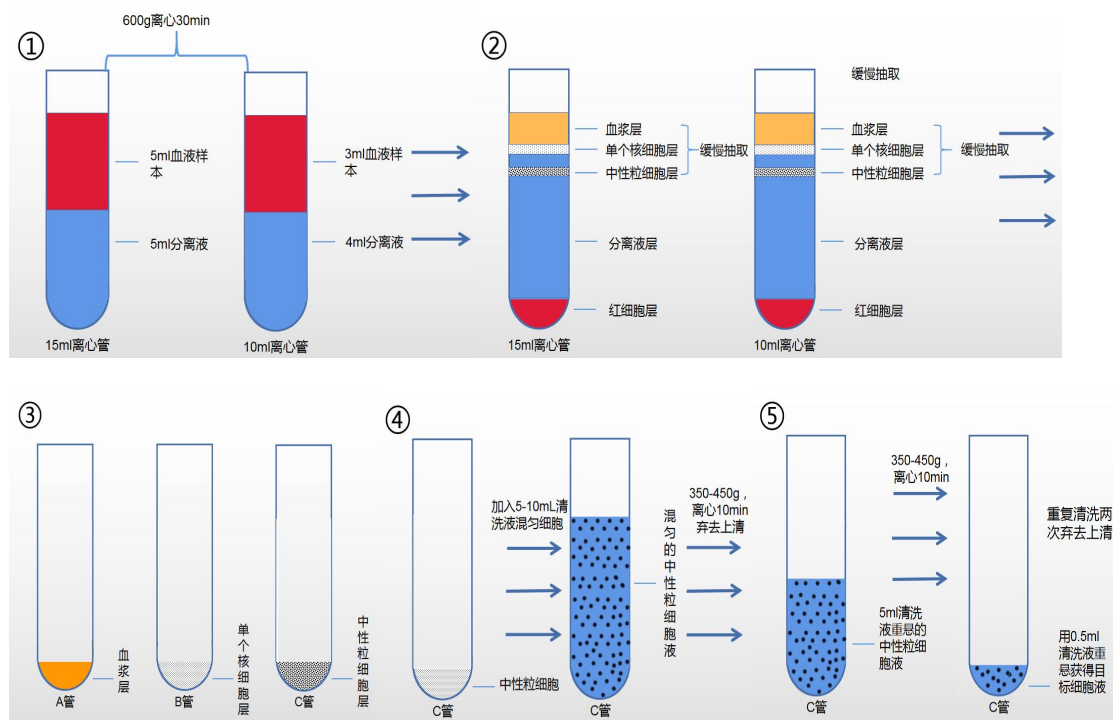
情况 A：血液样本量小于 5ml 时，实验方法如下：

- 取一支 15ml 无菌离心管，加入 5ml 分离液 1，再缓慢加入 5ml 血液样本。或取一支 10ml 无菌硅化离心管，加入 4ml 分离液 1，再缓慢加入 3ml 血液样本（分离液不得少于 3ml，血液样本不得少于 0.5ml）。



2. 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。）
3. 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。
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. 向中性粒细胞离心管 C 中，加入 5-10ml 清洗液（产品编号：2010X1118），混匀细胞。
6. 350-450g，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. 350-450g，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

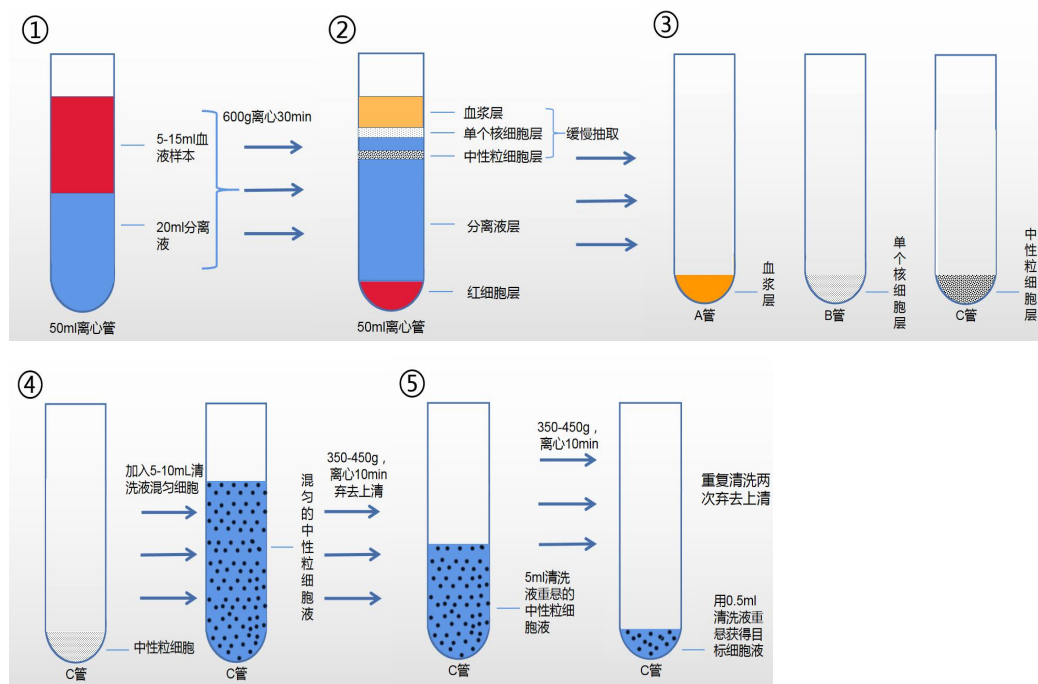




情况 B：血液样本量大于等于 5ml 时，实验方法如下：

1. 取 50ml 的无菌离心管，小心加入 20ml 分离液 1，加入血液样本量 5~15ml（总液体量不得超过 2/3）。
2. 以 600g，离心 30min。
3. 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。
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. 向中性粒细胞离心管 C 中，加入 5-10ml 清洗液（产品编号：2010X1118），混匀细胞。
6. 350-450g，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. 350-450g，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

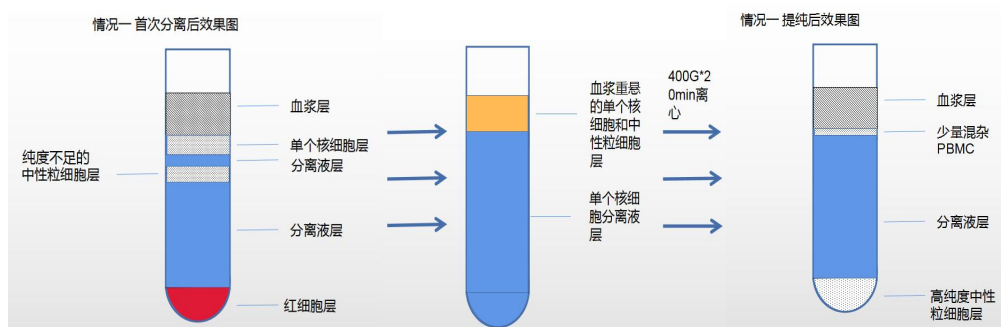




【分离过程中可能出现的情况及处理方案】

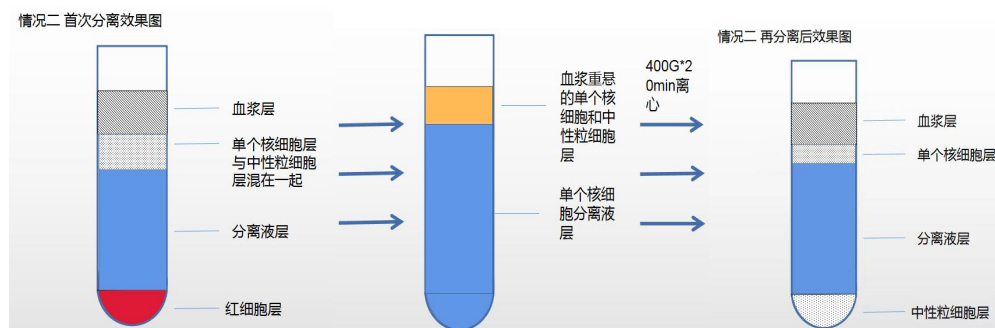
情况一：可见单个核细胞层和中性粒细胞层两层细胞（如果中性粒细胞纯度<70%提纯方法如此步骤）

1. 取中性粒细胞层，清洗后用备用的血浆 3-5ml 重悬细胞。
2. 使用单个核细胞分离液（产品编号：LDS1075 需另购）提纯。
 - a. 取 15ml 离心管，加入 5ml 单个核细胞分离液，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. 使用单个核细胞分离液（产品编号：LDS1075 需另购）重新提取中性粒细胞。
 - a. 取 15ml 离心管，加入 5ml 单个核细胞分离液，将用血浆重悬的 3-5ml 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。

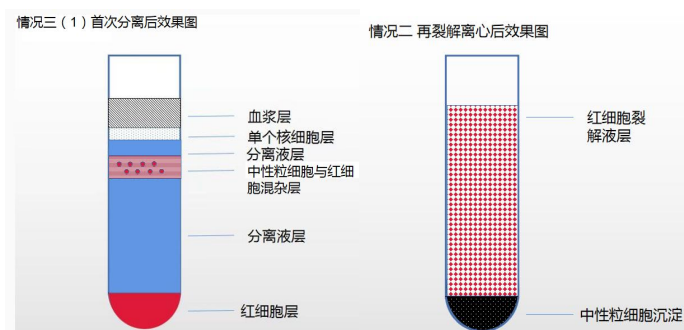




情况三(1): 中性粒细胞层混杂红细胞

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。
- 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。

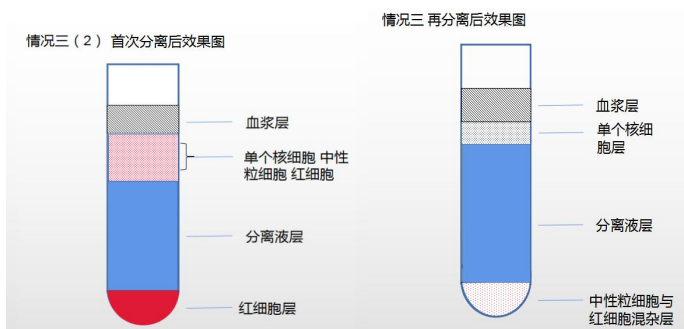
参考红细胞裂解液说明书（附后）操作。少时多次裂解后获得中性粒细胞。



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 3-5ml 重悬细胞。
2. 使用单个核细胞分离液（产品编号：LDS1075 需另购）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 单个核细胞分离液，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。

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。





细胞分选/富集试剂盒说明书合集

www.tbdscience.com

天津市灏洋生物制品科技有限责任公司

天津灏洋华海生物科技有限公司

【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. 如实验后细胞得率或活性过低，请联系天津灏洋技术支持以寻求帮助，具体联系方式详见下方生产企业信息。

【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°C 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）】

本实验中性粒细胞提取率大于 80%。

下表为成年人外周血中各种细胞的数量及比例，用户可适当进行参考。

	红细胞	白细胞			血小板
含量（个/L）	$(4.0-5.5) \times 10^{12}$	$(4.0-10.0) \times 10^9$			$(1.0-3.0) \times 10^{11}$
		中性粒细胞	淋巴细胞	单核细胞	
		50%-70%	20%-40%	3%-8%	

【可能存在的问题及解决方法】

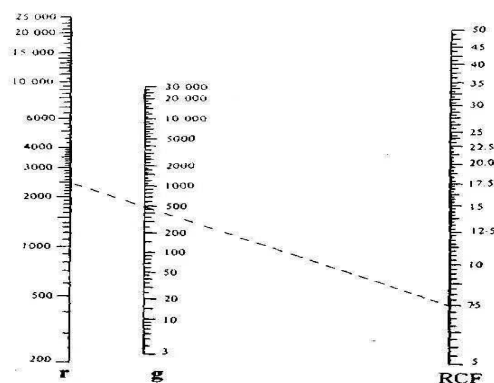
1. 由于血液粘度、细胞密度等差异可能造成的问题及解决方案如下表所示：

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



单位 rpm 与 g 的换算:



离心速度和离心力的换算
换算法: 在 r 标尺(单位 rpm)上取已知转速, 在 RCF 标尺上取已知的离心半径(单位 cm), 将这两点作一直线相连, 直线所通过的 g 标尺上的交叉点即为相应的离心力。

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

人外周血中性粒细胞分离不佳情况及解决方案

