

# “XX”动物组织白细胞分离液实验方法

## （细胞培养及分子生物学专用）

**技术文档编号：** TBD0032SOP

**【包装规格】**

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> | “XX”动物组织白细胞分离液 |           | 200ml |
| <b>B</b> | 组织样本稀释液（赠品）    | 2010C1119 | 200ml |
| <b>C</b> | 清洗液（赠品）        | 2010X1118 | 200ml |
| <b>D</b> | 匀浆冲洗液（赠品）      | F2013TBD  | 200ml |
| <b>E</b> | 红细胞裂解液（赠品）     | NH4CL2009 | 100ml |
| <b>F</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. 实验最佳分离时间**

为获得最佳的实验结果，最好在取样 2h 内进行实验，样品存放时间越长，细胞分离效果越差。样品放置超过 6h 后分离效果更差甚至不能达到分离目的。

**3. 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 20℃-25℃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。

#### 4. 无菌离心管

| 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 |
| 3  | PBMC 高效离心管/50ml          | 601001  | 20 支/盒  |
| 4  | PBMC 高效离心管/15ml          | 601002  | 5 支/包   |

#### 5. 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  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ （试剂需要复温。夏季  $20^{\circ}\text{C}$ ，冬季  $25^{\circ}\text{C}$ 。）的条件下进行。

#### 【组织样本细胞悬液的制备】

1. 取组织块称重后，用眼科剪刀无菌操作，将组织剪成小块。
2. 将组织块放在  $70\mu\text{m}$  细胞筛网(产品编号: TBDTM-SC, 需要另购)上，用研磨器反复揉搓，边揉搓边加入匀浆冲洗液（以 0.1g 组织为例，约加 5-8ml），使细胞全部通过筛网冲到离心管中。

注：需要让细胞形成单个的细胞悬液冲到离心管中，而不是被研磨挤压到离心管中。

目的：使组织形成单个的细胞，而不是成团或碎片组织。单个的细胞更易分离。

3. 弃去筛网，组织研磨液经 300-400g，离心 10min，弃去上清。
4. 用组织样本稀释液重悬组织细胞，将细胞悬液细胞浓度调整为  $2 \times 10^8$  --  $1 \times 10^9/\text{ml}$  (以 0.1g 组织为例，约使用 0.5-1ml 组织样本稀释液重悬细胞)，备用。

注：A. 多个动物组织需要分离时，应逐个单独进行，不可同时混合进行研磨。

B. 若发现匀浆冲洗液冲洗的细胞粘度较大，可进行以下处理：

- ①配置新冲洗液：4 份的匀浆冲洗液加 1 份的胰蛋白酶/EDTA 消化液（产品编号：TE2004Y 需另购）进行稀释，配置为新冲洗液。
- ②离心管预处理：再研磨开始之前，在离心管中加入 0.5-1ml 胎牛血清，进行保护和终止胰蛋白酶/EDTA 消化液。
- ③再进行 2,3,4 实验步骤即可。

## 各种规格离心管的使用方法（推荐最佳方法）

取一支无菌离心管，加入分离液，后缓慢加入（“XX”）组织单细胞悬液。细胞悬液小心加于分离液界面之上。（分离液的量不得少于 2ml，细胞悬液不得少于 0.2ml）  
**注：细胞悬液量较多时，需小量分离。细胞悬液量较多，会稀释分离液，影响分离效果。**

### 1. 使用 5ml 无菌玻璃离心管（货号：TUB2016）

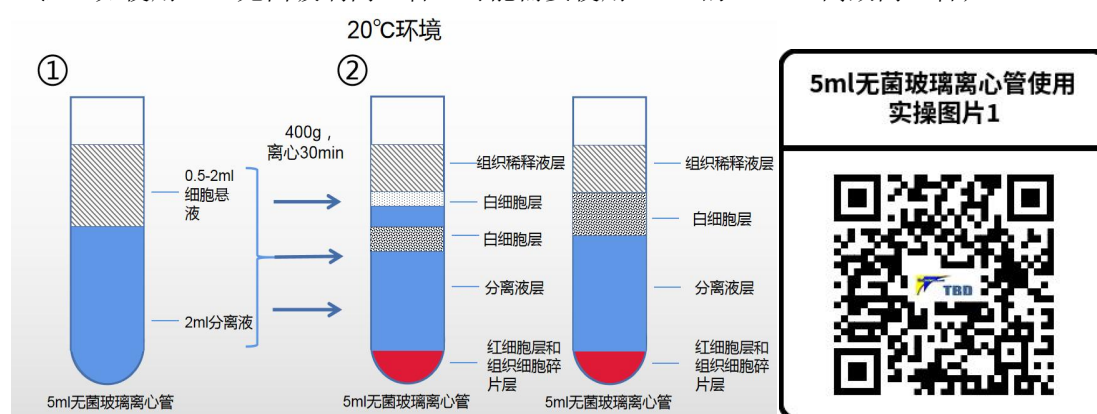
（或 10ml 无菌硅化离心管（货号：TUB2015））

A. 5ml 无菌玻璃离心管最佳比例：2ml 分离液+ 0.5-2.0ml 细胞悬液；

B. 10ml 无菌硅化离心管最佳比例：4ml 分离液+ 0.5-4.0ml 细胞悬液；

C. 最佳离心条件：20℃环境下，400g 离心 30min；

注：如使用 5ml 无菌玻璃离心管，可能需要使用 50ml 的 PBMC 高效离心管；

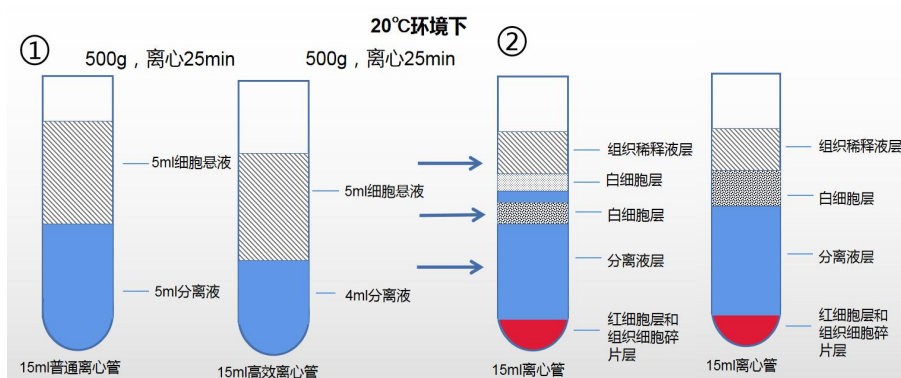


### 2. 使用 15ml 离心管（或 15ml 高效离心管）：

A. 15ml 普通离心管最佳比例：5ml 分离液+ 5ml 细胞悬液；

B. 15ml 高效离心管最佳比例：4ml 分离液+ 5ml 细胞悬液；

C. 最佳离心条件：20℃环境下，500g 离心 25min。



## 实验后续方案

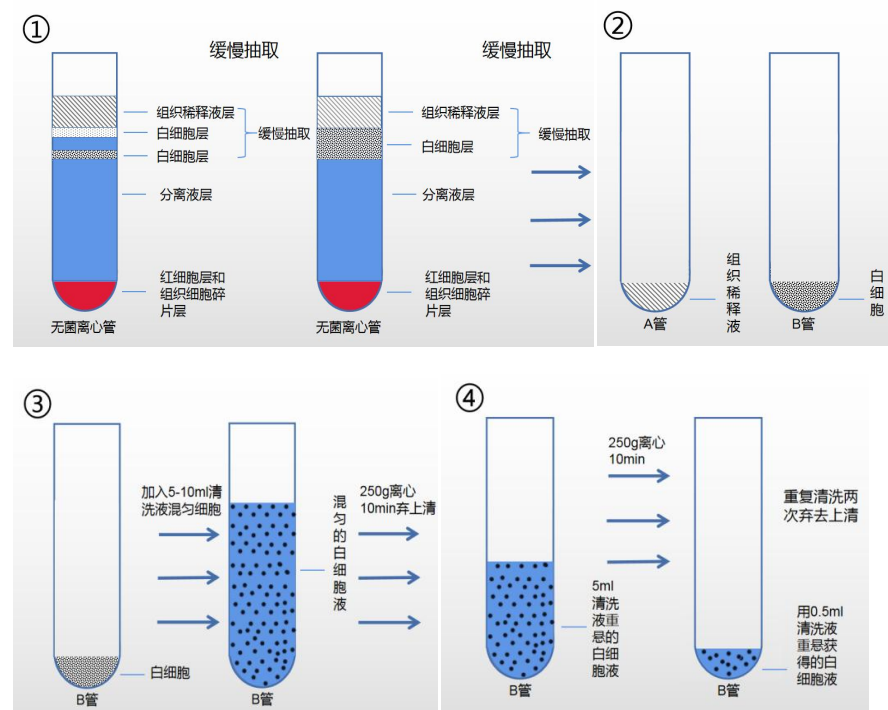
1. 离心后，离心管中由上至下分为五层。第一层为组织稀释液层。第二层为环状乳白色白细胞层。第三层为环状乳白色白细胞层。第四层为透明分离液层。第五层为红细胞层和组织细胞碎片层。

**注：离心管可能分为四层，第二层和第三层可能混淆在一起，全部取出即可。**

2. ①小心吸取组织稀释液层转移到新离心管 A 中。  
②小心吸取离心管中的第一层环状乳白色白细胞层转移到离心管 B 中  
③小心吸取离心管中的第二层环状乳白色白细胞层转移到离心管 B 中。
3. 向含有（“XX”）白细胞的离心管 B 中，加入 5-10ml 清洗液（产品编号：2010X1118），混匀细胞。
4. 250g，离心 10min。弃去上清。
5. 用吸管吸取 5ml 清洗液（产品编号：2010X1118）重悬所得细胞。
6. 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。

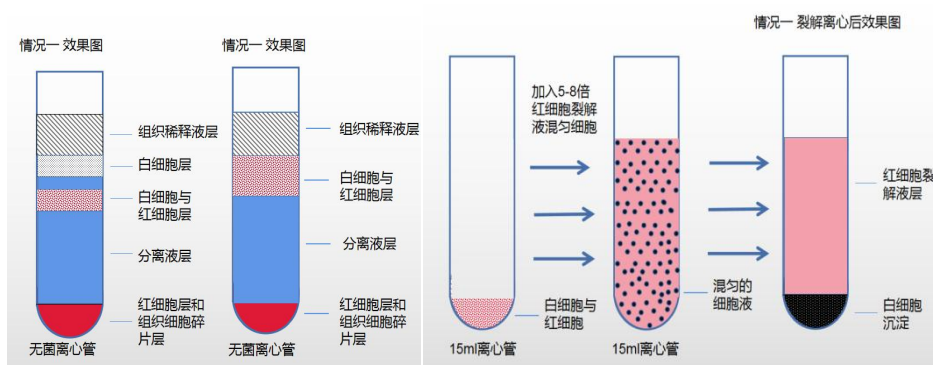
## 分离图例



## 【分离过程中可能出现的情况及处理方案】

### 情况一：白细胞层混杂红细胞

1. 吸取有红细胞混杂的白细胞层。
2. 取 15 毫升离心管加入红细胞混杂的白细胞层，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。
- b. 参考红细胞裂解液说明书操作。少时多次裂解后获得白细胞。



## 【注意事项】

1. 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。
2. 分离液用量大于组织单细胞悬液样本量时，分离效果更佳。
3. 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）】

本实验白细胞提取率大于 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

<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。