



人&各种动物组织单个核细胞分离液实验方法

技术文档编号: TBD0022SOP

【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
A	人&各种动物组织单个核细胞分离液		200ml
B	组织样本稀释液 (赠品)	2010C1119	200ml
C	清洗液 (赠品)	2010X1118	200ml
D	洗涤液 (赠品)	TBDTM-W	200ml
E	匀浆冲洗液 (赠品)	F2013TBD	200ml
F	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°C-25°C) 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°C-25°C 环境温度下进行操作, 20°C 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°C ，冬季 25°C 。）的条件下进行。

【组织样本的制备】

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: TBDM-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 2×10^8 -- $1 \times 10^9/\text{ml}$ （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。

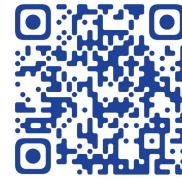
B. 用组织样本稀释液重悬组织细胞时，以小鼠或大鼠为例，约使用 0.5ml 或 1.0ml 组织样本稀释液重悬细胞。细胞悬液的细胞浓度约为 2×10^8 -- $1 \times 10^9/\text{ml}$ 。

C. 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（人&动物）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）

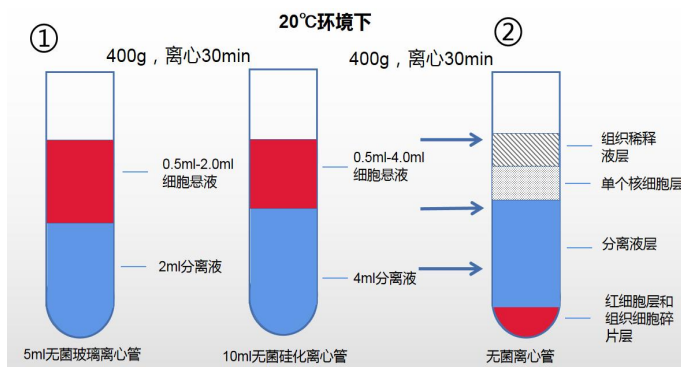
注：细胞悬液量较多时，需小量分离。细胞悬液量较多，会稀释分离液，影响分离效果。

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；

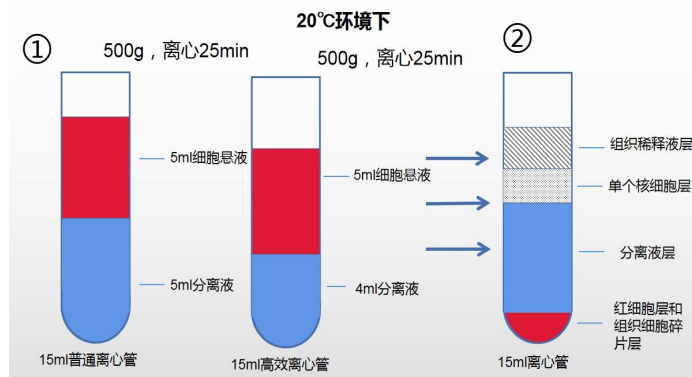
注：离心后，组织稀释液层下 1/3 处稀释液可能包含部分 PBMC 及少量分离液成分；



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。

注：离心后，组织稀释液层下 1/3 处稀释液可能包含部分 PBMC 及少量分离液成分；



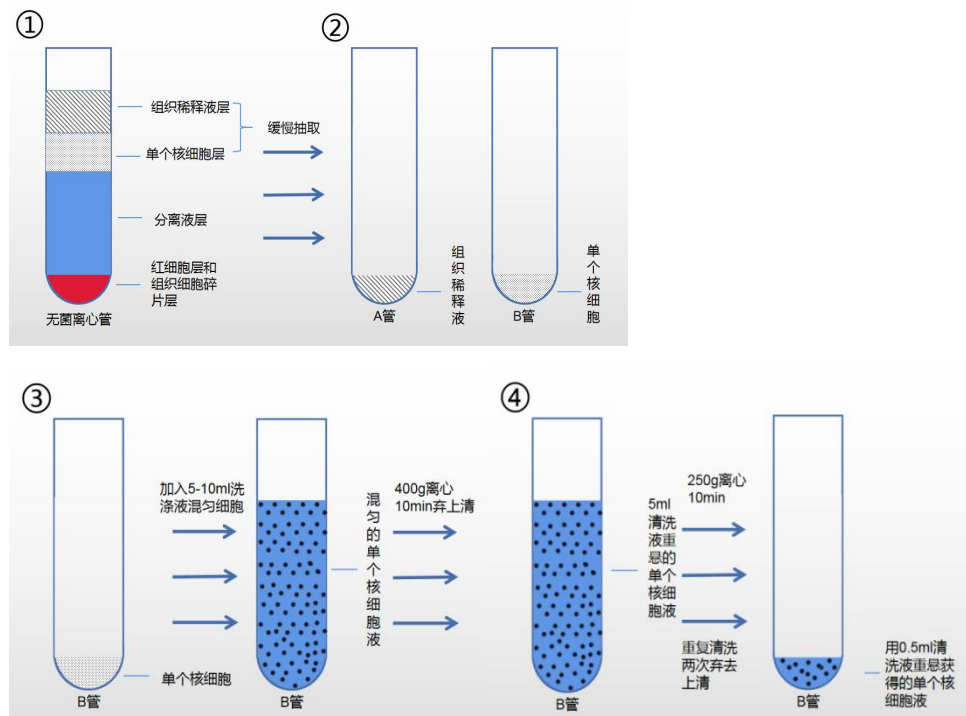


实验后续方案

- 离心后，离心管中由上至下分为四层。第一层为组织稀释液层。第二层为环状乳白色（人 & 动物）单个核细胞层（含有少量红细胞）。第三层为透明分离液层。第四层为红细胞层和组织细胞碎片层。
- 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环状乳白色（人 & 动物）单个核细胞层转移到离心管 B 中。
- 向含有（人 & 动物）单个核细胞的离心管 B 中，加入 5-10ml 洗涤液（产品编号：TBDTM-W）（0.1g 组织约加 5ml 洗涤液），混匀细胞。
- 400g，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。

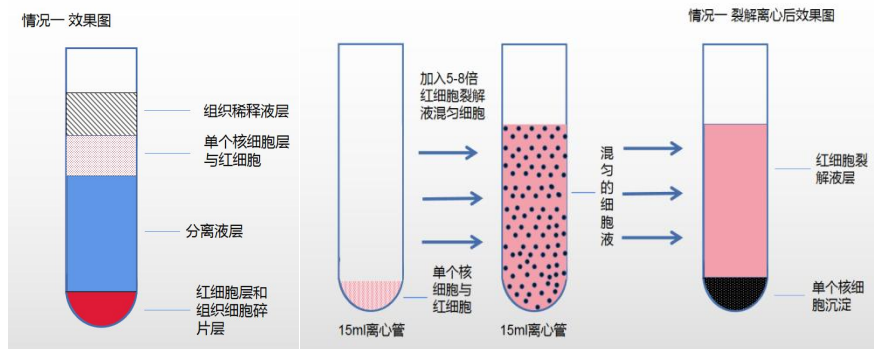
分离图例



【分离过程中可能出现的情况及处理方案】

情况一：单个核细胞层混杂红细胞

1. 吸取有红细胞混杂的单个核细胞层。
2. 取 15 毫升离心管加入红细胞混杂的单个核细胞层，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 需另购）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单个核细胞。



【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. 吸取过多的单个核细胞层及分离液层会导致分离液交界处的粒细胞被吸出从而使混杂的粒细胞数量增加。
3. 分离液用量大于组织单细胞悬液样本量时，分离效果更佳。
4. 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℃ 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）】

本实验单个核细胞提取率大于 80%。

【可能存在的问题及解决方法】

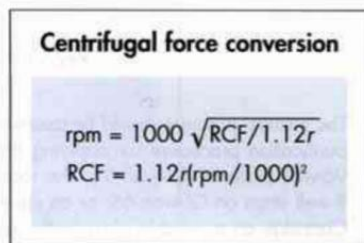
1. 由于血液粘度、细胞密度等差异可能造成的问题及解决方案如下表所示：



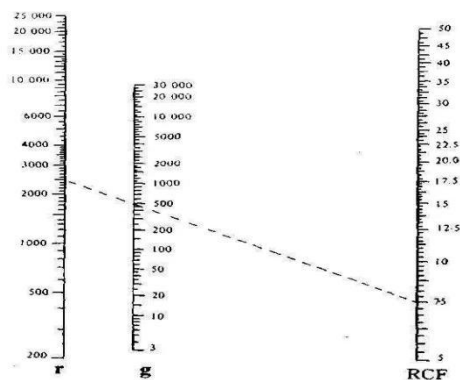
出现情况	出现原因	建议解决方案
离心后目的细胞存在于血浆层或稀释液层	转速过小或离心时间过短	适当增减转速
离心后目的细胞存在于分离液中	转速过大或离心时间过长	
离心后白环层弥散	细胞密度过大	调整细胞密度
离心后白环层太浅或看不见	细胞密度过小	

2. 离心力公式

单位 rpm 与 g 的换算:



rpm = revolutions per minute
RCF = relative centrifugal force (x g)
r = radius of rotor in mm



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), 将这两点作一连线相连接, 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。