



## 人&各种动物组织上皮细胞分离液实验方法

### 人血液样本选择

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。

技术文档编号：TBD0046SOP

#### 【包装规格】

2×200ml/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		200ml
<b>B</b>	分离液 2		200ml
<b>C</b>	匀浆冲洗液(赠品)	F2013TBD	200ml
<b>D</b>	组织样本稀释液(赠品)	2010C1119	200ml
<b>E</b>	清洗液(赠品)	2010X1118	200ml
<b>F</b>	洗涤液(赠品)	TBDTM-W	200ml
<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。)



细胞分选/富集试剂盒说明书合集

[www.tbdsience.com](http://www.tbdsience.com)

天津市灏洋生物制品科技有限责任公司

天津灏洋华科生物科技有限公司

## 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

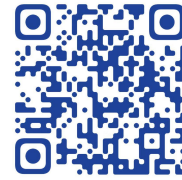
- 分离液需常温（15℃-25℃）避光保存，严禁冷藏冷冻保存；
- 使用时严格**遵守无菌操作规范**（超净工作台或生物安全柜内），并在 20℃-25℃ 环境温度下进行操作，20℃ 条件下分离效果最佳。超出此温度范围，有可能使分离液密度发生改变，造成分离效果不佳。

## 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。**

### 【组织上皮单细胞悬液的制备】

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  $0.1\text{g}$  组织为例, 约加  $5\text{-}8\text{ml}$ ), 使细胞全部通过筛网冲到离心管中。

**注: 需要让组织形成单个的细胞悬液冲到离心管中, 而不是被揉搓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  $300\text{-}400\text{g}$ , 离心  $10\text{min}$ , 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  $2 \times 10^8\text{-}1 \times 10^9/\text{ml}$  (以  $0.1\text{g}$  组织为例, 约使用  $0.5\text{-}1\text{ml}$  组织样本稀释液重悬细胞), 备用。

**注: A. 多个动物组织上皮需要分离时, 应逐个单独进行, 不可同时混合进行揉搓研磨。**

**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  $0.5\text{-}1\text{ml}$  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。

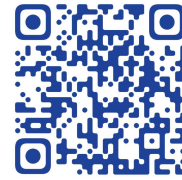
根据组织上皮样本单细胞悬液的量, 分以下两种情况:

**情况 A: 样本细胞悬液量  $0.5\text{-}1.5\text{ml}$  时, 实验方法如下:**

1. 取一支  $5\text{ml}$  无菌玻璃离心管 (货号: TUB2016), 先加入  $2\text{ml}$  分离液 1, 后缓慢加入  $1\text{ml}$  的分离液 2, 形成梯度界面。再缓慢加入  $0.5\text{-}1.0\text{ml}$  样本细胞悬液。样本细胞悬液小心加于分离液液界面之上, 各液面分层一定要清晰。(分离液总量不得少于  $2\text{ml}$ , 样本细胞悬液不得少于  $0.5\text{ml}$ )

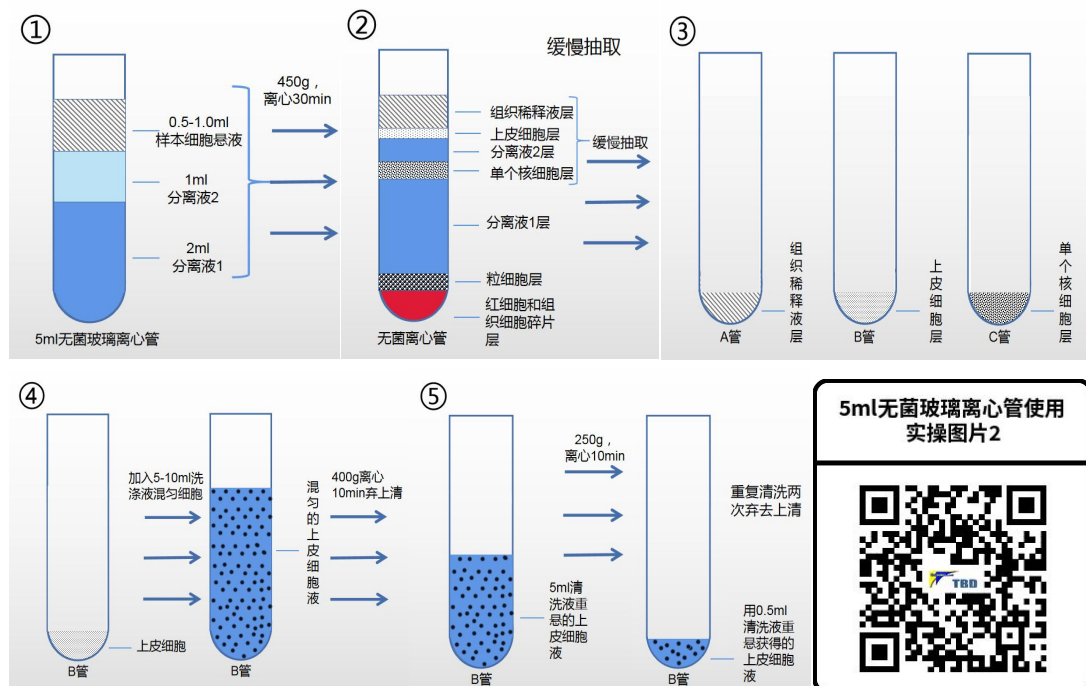
或 (取一支  $10\text{ml}$  无菌硅化离心管 (货号: TUB2015), 先加入  $3\text{ml}$  分离液 1, 后缓慢加入  $1.5\text{ml}$  的分离液 2, 形成梯度界面。再缓慢加入  $0.5\text{-}1.5\text{ml}$  样本细胞悬液。样本细胞悬液小心加于分离液液界面之上。(分离液总量不得少于  $4\text{ml}$ , 样本细胞悬液不得少于  $0.5\text{ml}$ )

**注: 两层分离液添加完成后, 需要在  $1\text{min}$  内添加样本细胞悬液。**



2. 以 450g，离心 30min。（注：如改变样本细胞悬液及分离液用量，需相应调整离心力及离心时间；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。）
3. 离心后，此时离心管中由上至下分为六层。第一层为组织稀释液层。第二层为环状乳白色上皮细胞层（第一层白环及上层 50%分离液 2）。第三层为环状乳白色单个核细胞层（下层 50%分离液 2 及第二层白环）。第四层为透明分离液 1 液层。第五层为粒细胞层。第六层为红细胞和组织细胞碎片层。
4. 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&各种动物）上皮细胞层转移到新离心管 B 中。  
③小心吸取离心管中的环状乳白色单个核细胞层转移到新离心管 C 中。
5. 向含有（人&各种动物）上皮细胞的离心管 B 中，加入 5-10ml 洗涤液（产品编号：TBDTM-W），混匀细胞。
6. 400g，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





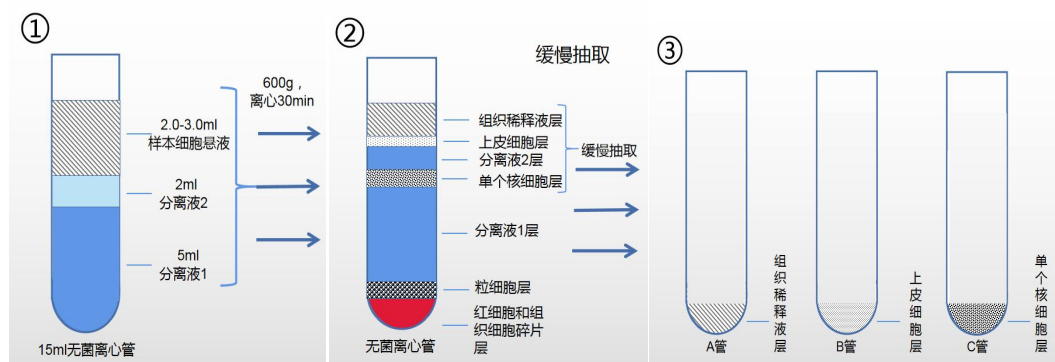
**情况 B: 样本细胞悬液量 2.0-3.0ml 时, 实验方法如下:**

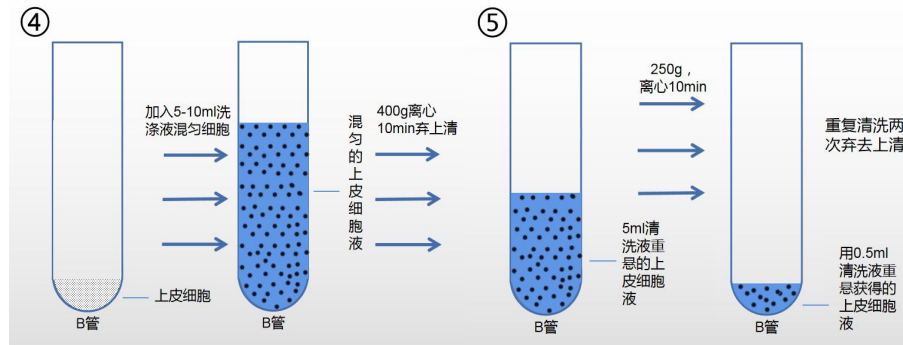
1. 取一支 15ml 无菌离心管, 先加入 5ml 分离液 1, 后缓慢加入 2ml 分离液 2, 形成梯度界面, 再缓慢吸取 2-3ml 样本细胞悬液加于分离液液面之上。各液面分层一定要清晰。(总液体量不得超过 2/3)。

**注: 两层分离液添加完成后, 需要在 1min 内添加样本细胞悬液。**

2. 以 600g, 离心 30min。
3. 离心后, 此时离心管中由上至下分为六层。第一层为组织稀释液层。第二层为环状乳白色上皮细胞层 (第一层白环及上层 50% 分离液 2)。第三层为环状乳白色单个核细胞层 (下层 50% 分离液 2 及第二层白环)。第四层为透明分离液 1 液层。第五层为粒细胞层。第六层为红细胞和组织细胞碎片层。
4. 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 & 各种动物) 上皮细胞层转移到新离心管 B 中。  
③小心吸取离心管中的环状乳白色单个核细胞层转移到新离心管 C 中。
5. 向含有 (人 & 各种动物) 上皮细胞的离心管 B 中, 加入 5-10ml 洗涤液 (产品编号: TBDTM-W), 混匀细胞。
6. 400g, 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**

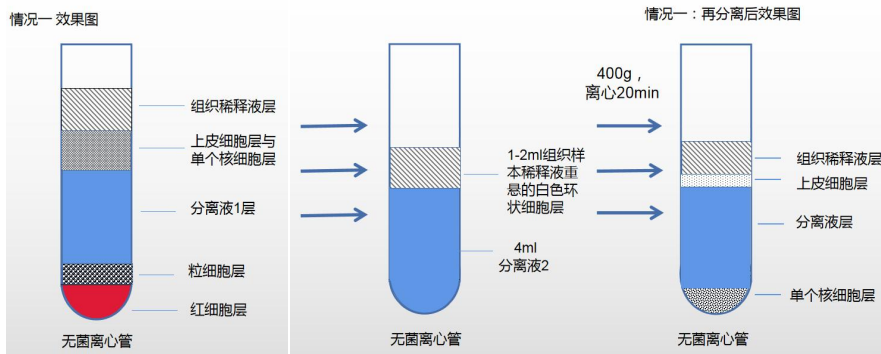




### 【分离过程中可能出现的情况及处理方案】

#### 情况一：上皮细胞层和单个核细胞层混在一起不能分开

1. 吸取全部白色环状细胞层，清洗后用组织样本稀释液 1-2ml 重悬细胞。
2. 使用分离液 2 重新提取上皮细胞。
3. 取 15ml 离心管，加入 4ml 分离液 2，将用组织样本稀释液重悬的 1-2ml 细胞缓慢加于分离液之液面上，400g，离心 20min。
4. 离心后，离心管可分为 4 层，第一层组织稀释液层，第二层上皮细胞层，第三层分离液层，第四层单个核细胞层。
5. 可重复检验方法中的目的细胞洗涤方法，获得上皮细胞。



### 【注意事项】

1. 全过程样本、试剂及实验环境均需在  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  的条件下进行。为获得最佳的实验结果，最好在取样 2h 内进行实验，样本存放时间越长，细胞分离效果越差。样本放置超过 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. 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）】**

本实验上皮细胞提取率大于80%。

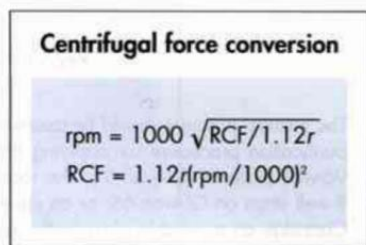
**【可能存在的问题及解决方法】**

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：

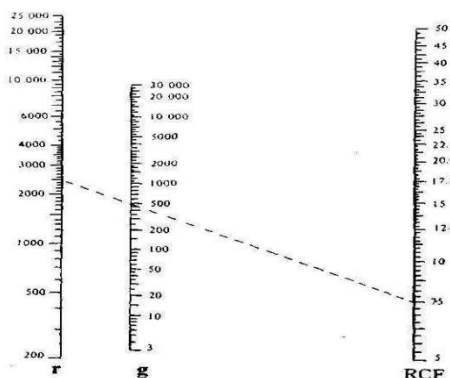
出现情况	出现原因	建议解决方案
离心后目的细胞存在于血浆层或稀释液层	转速过小或离心时间过短	适当增减转速
离心后目的细胞存在于分离液中	转速过大或离心时间过长	
离心后白环层弥散	细胞密度过大	调整细胞密度
离心后白环层太浅或看不见	细胞密度过小	

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。