人&各种动物骨髓内皮祖细胞分离液实验方法

实验动物选择：绵羊不适用于本试剂盒。

实验小鼠品系选择：部分 C57 小鼠不适用于本试剂盒。

（注：C57 小鼠易出现红细胞沉降不完全，甚至完全不沉降的现象，请慎重选择。）

技术文档编号： TBD0045SOP

【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
A	分离液 1		200ml
B	分离液 2		200ml
C	组织样本稀释液(赠品)	2010C1119	200ml
D	清洗液(赠品)	2010X1118	200ml
E	匀浆冲洗液(赠品)	F2013TBD	200ml
F	洗涤液 (赠品)	TBDTM-W	200ml
G	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

骨髓细胞离体后 2 小时内尽快完成实验。骨髓细胞离体后，时间越长体外细胞活性越差。

3. 分离液的使用环境

a. 分离液需常温（37℃-15℃）避光保存，严禁冷藏冷冻保存；

b. 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。

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±2℃（试剂需要复温。夏季 20℃，冬季 25℃。）的条件下进行。

【骨髓单细胞悬液的制备】

1. 人＆大型动物需要进行骨髓穿刺手术，来获得骨髓。
2. 大小鼠等小型实验动物以适当方式处死动物，剥离出股骨或胫骨，用剪刀剪断骨头两端，露出内腔。用注射器吸取适量(根据动物大小)的匀浆冲洗液(产品编号：F2013TBD)冲洗出内腔中的骨髓。
3. 收集骨髓或骨髓悬液到合适离心管中，反复吹打成单细胞悬液，以 70μm 细胞筛网(产品编号：TBDTM-SC，需要另购)过滤。
4. 以 450g，离心 10min，弃上清。
5. 用组织样本稀释液 (产品编号：2010C1119)重悬细胞浓度为 2×10^8- 1×10^9/ml 的单细胞悬液备用(以小鼠为例，一般使用 1ml 组织样本稀释液重悬骨髓细胞)。

根据骨髓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 0.5-1.5ml 时，实验方法如下：

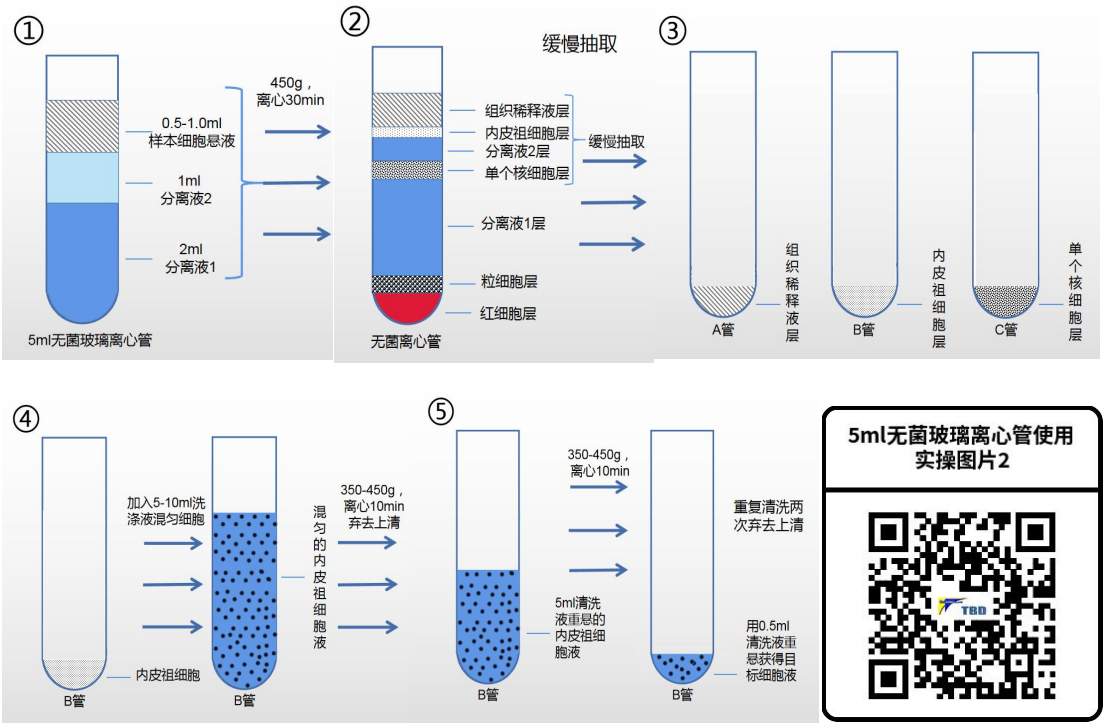
1. 取一支 5ml 无菌玻璃离心管（货号：TUB2016），先加入 2ml 分离液 1，后缓慢加入 1ml 的分离液 2，形成梯度界面。再缓慢加入 0.5-1.0ml 样本细胞悬液。样本细胞悬液小心加于分离液液界面之上，各液面分层一定要清晰。（分离液总量不得少于 2ml，样本细胞悬液不得少于 0.5ml）

或（取一支 10ml 无菌硅化离心管（货号：TUB2015），先加入 3ml 分离液 1，后缓慢加入 1.5ml 的分离液 2，形成梯度界面。再缓慢加入 0.5-1.5m 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 4ml，样本细胞悬液不得少于 0.5ml)

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 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内皮祖细胞层 (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内皮祖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. 向含有内皮祖细胞的离心管 B 中，加入 5-10ml 洗涤液（产品编号：TBDTM-W），混匀细胞。
6. 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：样本细胞悬液量 2.0-3.0ml 时，实验方法如下：

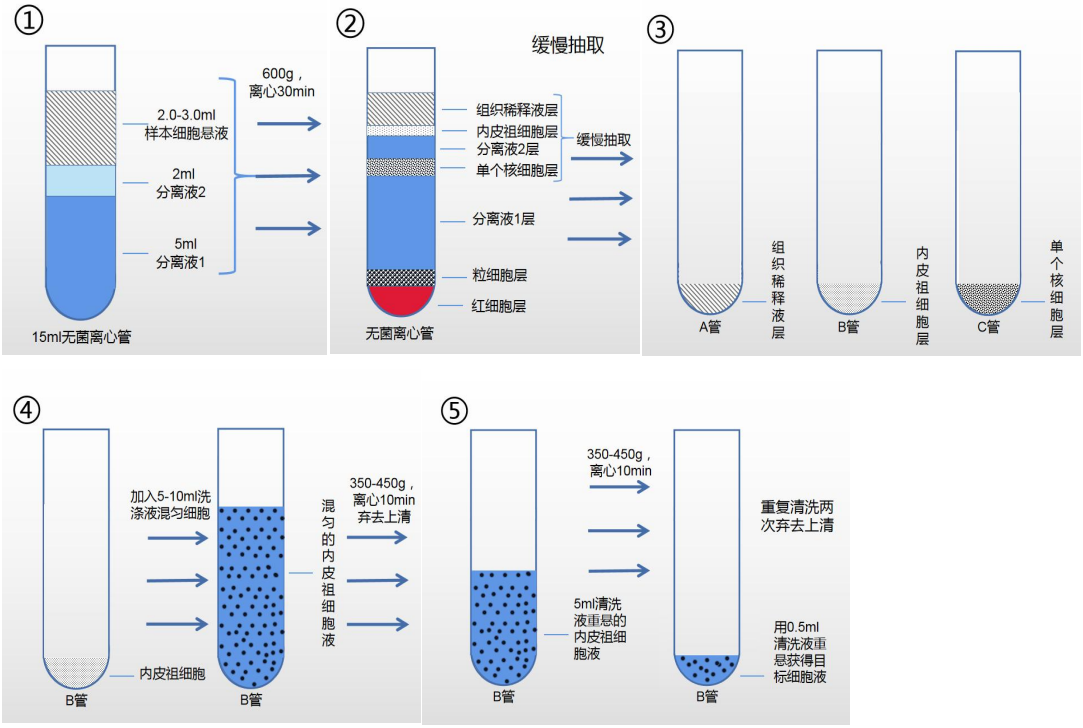
1. 取一支 15ml 无菌离心管，先加入 5ml 分离液 1，后缓慢加入 2ml 分离液 2，形成梯度界面，再缓慢吸取 2-3ml 样本细胞悬液加于分离液液面之上。各液面分层一定要清晰。（总液体量不得超过 2/3）。

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内皮祖细胞层 (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内皮祖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. 向含有内皮祖细胞的离心管 B 中，加入 5-10ml 洗涤液（产品编号：TBDTM-W），混匀细胞。

6. 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。

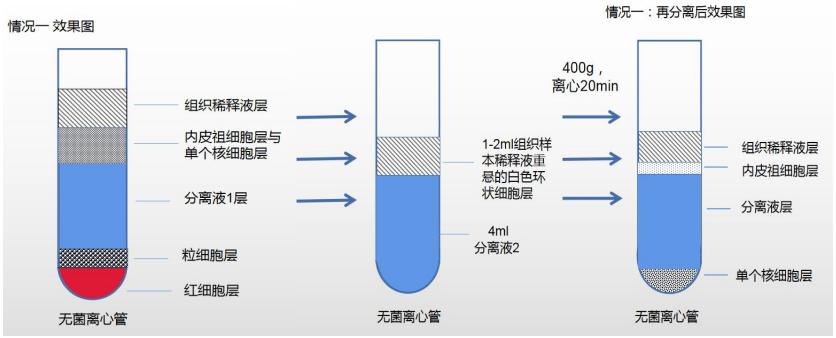
分离图例



【分离过程中可能出现的情况及处理方案】

情况一：内皮祖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 重新提取内皮祖细胞。
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，第二层内皮祖细胞层，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，获得内皮祖细胞。



【注意事项】

1. 全过程样本、试剂及实验环境均需在 20±2℃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）】

本实验内皮祖细胞提取率及纯度大于 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

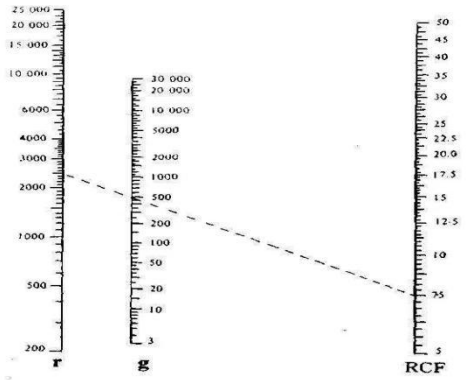
单位 **rpm** 与 **g** 的换算:

Centrifugal force conversion

$$rpm = 1000\sqrt{RCF/1.12r}$$

$$RCF = 1.12r(rpm/1000)^2$$

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。