

人骨髓中性粒细胞分离试剂盒

货号：CS123

规格：200ml

产品介绍

本产品是一种用于分离人骨髓中性粒细胞的无菌、低内毒素水平的密度梯度分离液。无菌条件下所分离的细胞可用于免疫学检测。其分离原理是根据细胞的密度差异将葡聚糖（右旋糖酐）和泛影酸钠按一定比例混合，调整比重、pH 值和渗透压，经过澄清及过滤除菌后制成一种密度梯度分离液，经过密度梯度离心使一定密度的细胞按相应密度梯度分布，从而将各种细胞加以分离。通过离心使一定密度的细胞按相应密度梯度分布，从而将中性粒细胞从骨髓分离出来。

试剂盒组成：

试剂 A:	200mL	室温避光保存
试剂 C:	100mL	室温避光保存
红细胞裂解液:	100mL	室温保存
细胞洗涤液:	200mL	室温保存
全血及组织稀释液:	200ml	室温保存

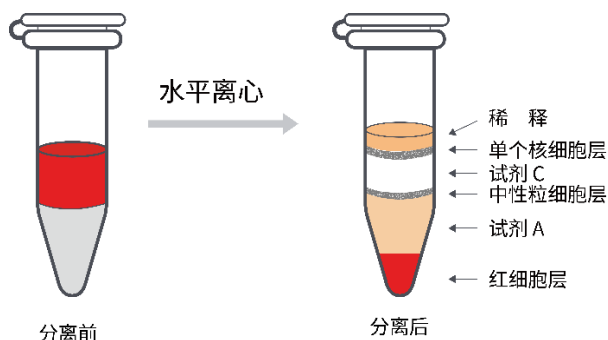
保质条件：未开封时可于室温避光保存，有效期 2 年；开封后室温保存。

产品参数：

密度：1.113±0.001g/mL
渗透压：290~350 mOsm/kg H₂O
无菌：0.1 μm 滤膜过滤

中性粒细胞分离方法：

1. 制备骨髓的单细胞悬液。
2. 细胞悬液体积小于 5mL 时，在离心管中先加入 4mL 试剂 A，后将 2mL 试剂 C 小心叠加于试剂 A 之上，形成梯度界面（细胞悬液体积大于等于 5mL，试剂 A 与试剂 C 比例 2: 1，试剂总量与稀释后的样本量相等。但二者的总体积不能超过离心管的三分之二，否则会影响分离效果），将细胞悬液平铺到分离液液面上方，注意保持两液面界面清晰。（可以使用巴氏德吸管吸取细胞悬液，然后将细胞悬液小心的平铺于分离液上，因为两者的密度差异，将形成明显的分层界面。如果样品较多，加样的时间较长，在离心之前出现红细胞成团下沉属正常现象）。
3. 室温，水平转子 500~1000g，离心 20~30min（细胞悬液的体积越大所需的离心力越大，离心时间越长，最佳的分离条件需摸索，离心转速最大不超过 1200g）。
4. 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，如图所示（个体差异或者是分离条件不同，粒细胞层可分离不明显）。



5. 用吸管小心吸取试剂 C 与试剂 A 之间以及试剂 A 中的中性粒细胞到 15mL 洁净的离心管中，10mL PBS 或细胞洗涤液洗

涤细胞。250g，离心 10min（如有红细胞混杂则加入适量红细胞裂解液）。

6. 弃上清，5mL 的 PBS 或细胞清洗液重悬细胞，250g，离心 10min。

7. 重复步骤 6。

8. 弃上清，细胞重悬备用。

骨髓单细胞悬液制备方法（供参考）：

1. 小动物骨髓的采集：

1. 处死动物，无菌提取股骨和胫骨，剪去两端软骨，露出红色的骨髓腔（注意尽可能少的剪走骨髓腔）。

2. 取 1ml 的无菌注射器，吸取少量的含有 10%标准胎牛血清的稀释液或者是含有血清的培养基或是 1XPBS 稀释液，冲洗骨髓腔以获得骨髓。

3. 最终制备成 $2 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ /ml 的骨髓单细胞悬液备用。

2. 大动物骨髓的采集：大动物骨髓的采集可采取活体穿刺方法：先将动物麻醉、固定、局部除毛、消毒皮肤，然后估计好皮肤到骨髓的距离，把骨髓穿刺针的长度固定好。操作人员用左手把穿刺点周围的皮肤绷紧，右手将穿刺针在穿刺点垂直刺入，轻轻左右旋转将穿刺针钻入，当穿刺针进入骨髓腔时常有落空感。连接注射器缓慢抽吸骨髓组织，当注射器内抽到少许骨髓时即停止抽吸。用含 10%标准胎牛血清的稀释液调整细胞浓度为 $2 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ /ml 的单细胞悬液备用。

3. 常用的骨髓穿刺点：

股骨：穿刺部位在股骨内侧面，靠下端的凹面处；

胸骨：穿刺部位是胸骨体与胸骨柄连接处；

肋骨：穿刺部位是第 5~7 肋骨各点的中点；

胫骨：穿刺部位是胫骨内侧、靠下端的凹面处。如果穿刺采用的是肋骨，穿刺结束后要用胶布封贴穿刺孔，防止发生气胸。

注意事项：

1. 开封前颠倒混匀，本分离液为无菌产品，为延长分离液保存时间，请在无菌条件下启封，避免污染。
2. 本实验要求，在正常大气压下，分离液、分离样本以及分离环境温度为（18℃~25℃）。分离液在低温时呈较高密度，在高温时呈较低密度。4℃或者是温度较低的条件离心，可能会导致白膜层中红细胞污染加重。
3. 稀释血液或洗涤细胞，不可使用含 Ca、Mg 离子的缓冲液及培养液，其成分会导致血细胞凝集，大大降低细胞得率及纯度。
4. 由于各品牌离心机的性能不同，实验室环境温度差异，可能影响分离效果，用户可以调节离心转数和离心时间，摸索最佳的分离条件（具体分离条件各实验室自定）。
5. 部分塑料制品（如聚苯乙烯）因其带有的静电作用，可能会导致细胞挂壁，影响分离效果。最好使用无静电反应的离心管，推荐使用未经过碱处理的玻璃离心管。
6. 细胞重悬样本的粘稠度或者是温度差异，可能会影响分离效果，可以调节离心转数和离心时间，请摸索最佳的分离条件。
7. 如果要进一步对分离的细胞进行培养，在收集和分离过程中，注意无菌操作，避免污染。
8. 不同动物的组织细胞重悬在不同比重分离液中的细胞离散系数及细胞带电不同，用户在制定分离液时应提供所需分离液的比重、动物种属及被分离细胞的名称。

可能存在的问题及解决方法：

1. 离心后目的细胞存在于血浆层或稀释液层，可能原因是转速过小或离心时间过短，解决办法可以适当增加转速。
2. 离心后目的细胞存在于分离液中，可能原因是转速过大或离心时间过长，解决办法可以适当减转速。
3. 离心后白膜层弥散，可能原因是细胞密度过大，解决办法适当调整细胞密度。
4. 离心后白膜层太浅或看不见，可能原因是细胞密度过小，解决办法适当调整细胞密度。