

人子宫内膜淋巴细胞分离液实验方法

货号: P5680

规格: 200 mL

保存: 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。

产品内容:

名称	规格
分离液 1	200mL
分离液 2	200mL
样本稀释液	200mL
清洗液	200mL
匀浆冲洗液	200mL

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

组织样本的制备 (仅供参考):

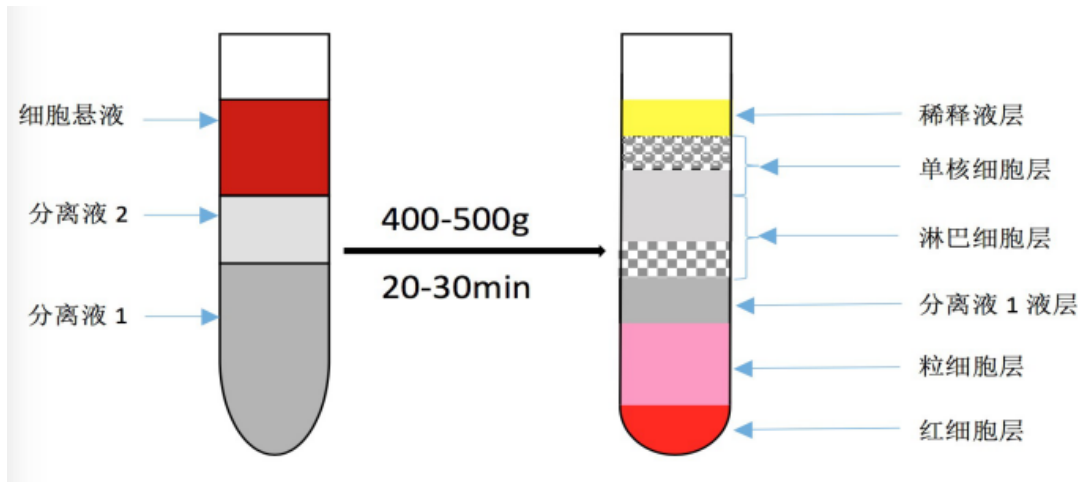
1. 以适当方式处死动物, 剥离出股骨或胫骨, 用剪刀剪断骨头两端, 露出内腔。
2. 用注射器吸取适量 (根据动物大小) 的匀浆冲洗液冲洗出内腔中的骨髓。
3. 收集悬液到合适离心管中, 反复吹打成单细胞悬液, 以 70 μ m 细胞筛网 (自备) 过滤。
4. 450g, 离心 10min, 弃上清。
5. 用样本稀释液重悬细胞浓度为 2×10^8 - 1×10^9 /mL 的单细胞悬液备用 (以小鼠为例, 一般使用 1mL 样本稀释液重悬骨髓细胞)。

检验方法 (仅供参考):

全过程样本、试剂及实验环境均需在 20 \pm 2℃ 的条件下进行。

- 1、取一支离心管, 依次小心加入分离液 1、分离液 2 (体积比为 3:1, 试剂总量与细胞悬液体积比为 2: 1。如细胞悬液为 2ml, 则先后加入分离液 1: 3ml、分离液 2: 1ml。试剂总量最少不低于 4ml。), 制成梯度界面, 各液面分层一定要清晰。
- 2、用吸管小心吸取细胞悬液加于分离液液面上, 水平转子 400-500g, 离心 20-30min (注: 根据样本量确定离心条件, 血液样本量越多, 离心力越大, 离心时间越长, 具体离心条件需客户自行摸索, 以达到最佳分离效果)。
- 3、离心后, 此时离心管中由上至下分为六层。第一层为稀释液层。第二层为环状乳白色单核细胞层 (第一层白环及上层 50%分离液 2)。第三层为环状乳白色淋巴细胞层 (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、用吸管小心吸取第二层到另一 15ml 离心管中, 往所得离心管中加入 10ml 清洗液, 混匀细胞。
- 5、250g, 离心 10min。
- 6、弃上清。

- 7、用吸管以 5-10ml 清洗液重悬所得细胞。
- 8、250g，离心 10min。
- 9、重复 7、8、9，弃上清后以 0.5ml 后续实验所需相应液体重悬细胞。



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，避免微生物污染。
2. 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。
3. 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。
4. 分离液用量大于脏器组织单细胞悬液样本量时，分离效果更佳。

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、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。

3、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。