



TBD

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

人&各种动物组织中性粒细胞分离液 KIT 说明书

技术文档编号: TBD0035SOP

【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	分离液 1		200ml
B	匀浆冲洗液（赠品）	F2013TBD	200ml
C	组织样本稀释液（赠品）	2010C1119	200ml
D	清洗液（赠品）	2010X1118	200ml
E	红细胞裂解液（赠品）	NH4CL2009	100ml
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℃-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

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 - 1 -

天津滨海新区华苑产业区（环外）海泰华科一路 15 号润丰科技 3 幢 5 层

技术服务 Tel: 15822121119 15822691119 13920701119 ◆ Fax: 022-58921250 ◆ QQ: 2768676807

www.tbdsience.com ◆ E-mail: gx15822121119@163.com

灏洋生物 TBDSciences



TBD

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

序号	产品名称	产品货号	规格
1	无菌硅化离心管/10ml(随试剂盒附赠 5 支)	TUB2015	100 支/包
2	PBMC 高效离心管/50ml	601001	20 支/盒
3	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：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 $5\text{-}8\text{ml}$ ），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 $300\text{-}400\text{g}$ ，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 $2\times 10^8\text{--}1\times 10^9/\text{ml}$ （以 0.1g 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. 多个动物组织需要分离时，应逐个单独进行，不可同时混合进行研磨。

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。

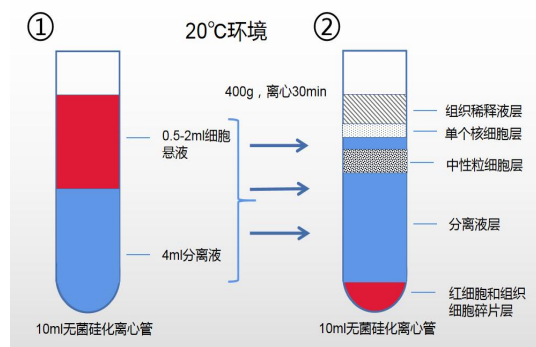
各种规格离心管的使用方法（推荐最佳方法）

取一支无菌离心管，加入分离液 1，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 3ml，细胞悬液在 0.2-4ml 之间）

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。

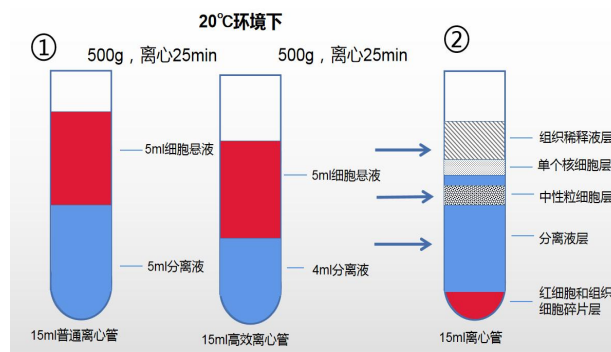
1. 使用 10ml 无菌硅化离心管：

- 10ml 无菌硅化离心管最佳比例：4ml 分离液+ 0.5-2.0ml 细胞悬液；
- 最佳离心条件：20℃环境下，400g 离心 30min。



2. 使用 15ml 离心管（或 15ml 高效离心管）：

- 15ml 普通离心管最佳比例：5ml 分离液+ 5ml 细胞悬液；
- 15ml 高效离心管最佳比例：4ml 分离液+ 5ml 细胞悬液；
- 最佳离心条件：20℃环境下，500g 离心 25min。

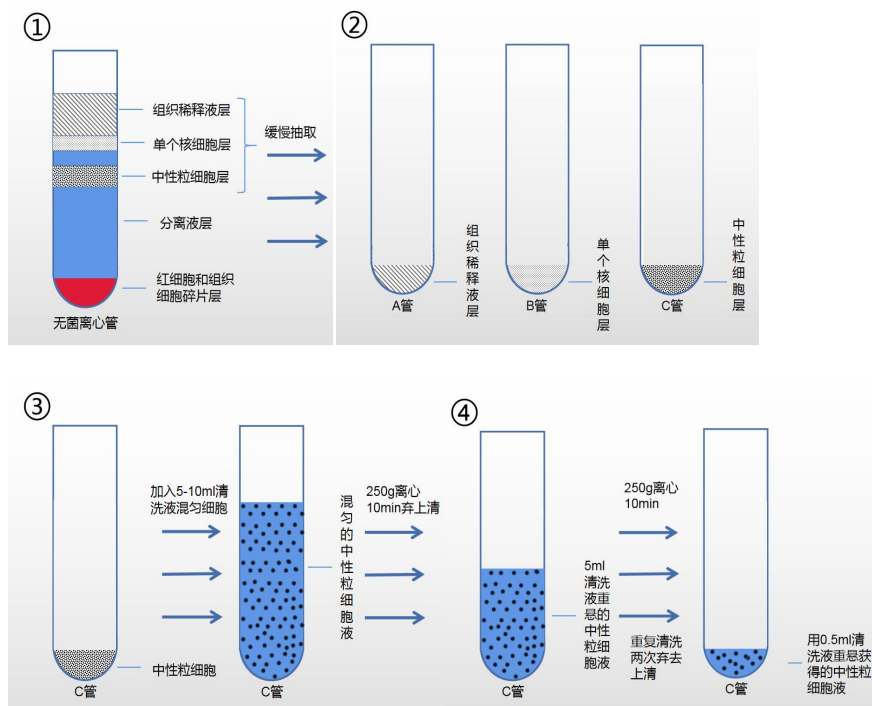


实验后续方案

- 离心后，离心管中由上至下分为五层。第一层为组织稀释液层。第二层为环状乳白色单个核细胞层。第三层为环状乳白色（人&动物）中性粒细胞层。第四层为透明分离液层。第五层为红细胞层和组织细胞碎片层。

2. 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单个核细胞层转移到离心管 B 中
 - ③小心吸取离心管中的环状乳白色（人&动物）中性粒细胞层转移到离心管 C 中。
 3. 向含有（人&动物）中性粒细胞的离心管 C 中，加入 5-10ml 清洗液（产品编号：2010X1118），混匀细胞。
 4. 250g，离心 10min。弃去上清。
 5. 用吸管吸取 5ml 清洗液（产品编号：2010X1118）重悬所得细胞。
 6. 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：中性粒细胞层混杂红细胞

1. 吸取有红细胞混杂的中性粒细胞层。
2. 取 15 毫升离心管加入红细胞混杂的中性粒细胞层，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）将红细胞裂解（具

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 - 4 -

天津滨海高新区华苑产业区（环外）海泰华科一路 15 号润丰科技 3 幢 5 层

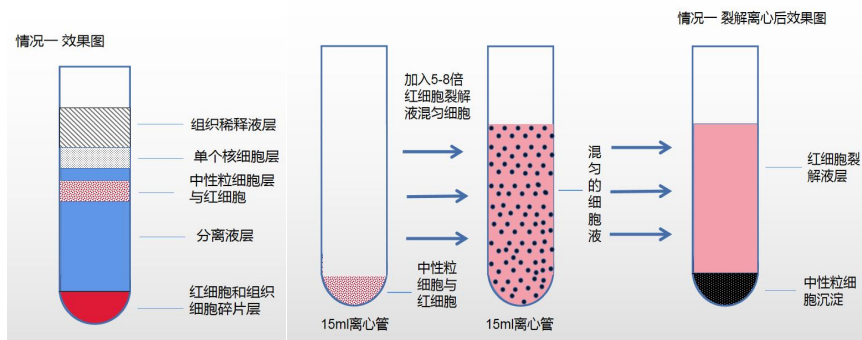
技术服务 Tel: 15822121119 15822691119 13920701119 ◆ Fax: 022-58921250 ◆ QQ: 2768676807

www.tbdscience.com ◆ E-mail: gx15822121119@163.com

灏洋生物 TBDsciences

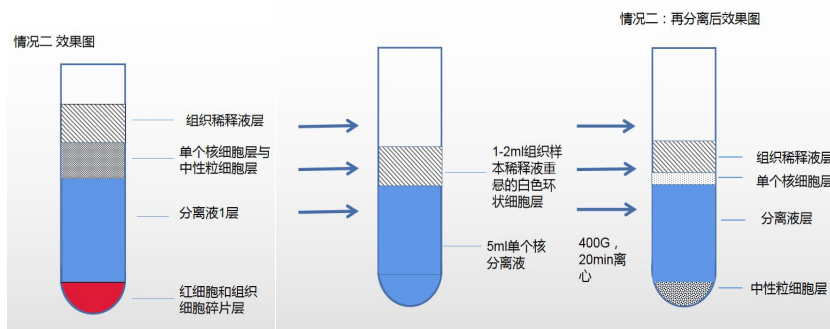
体方法见“红细胞裂解液使用说明”)即得目的细胞。

b. 参考红细胞裂解液说明书操作。少时多次裂解后获得中性粒细胞。



情况二：单个核细胞层和中性粒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. 使用单个核细胞分离液（产品编号：LDS1075 需另购）提纯。
3. 取 15ml 离心管，加入 5ml 单个核细胞分离液，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，离心管可分为四层，第一层组织稀释液层，第二层单个核细胞层，第三层分离液层，第四层中性粒细胞层。
5. 可重复检验方法中的目的细胞洗涤方法，获得中性粒细胞。



【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过的玻璃制品，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. 分离液用量大于组织单细胞悬液样本量时，分离效果更佳。
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）】

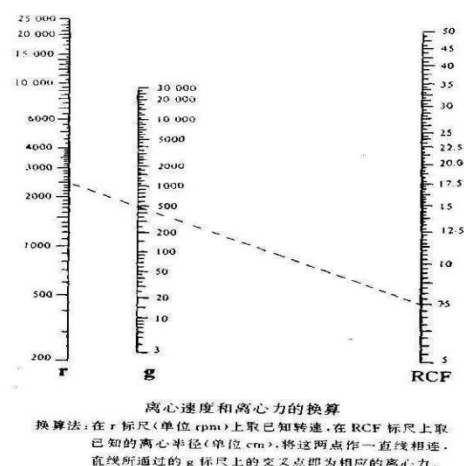
本实验中性粒细胞提取率大于 80%。

【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



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。