



细胞分选/富集试剂盒说明书合集

www.tbdscience.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

大(小)鼠外周血中性粒细胞分离液 KIT 说明书

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。)

【产品规格】

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 (大/小鼠外周血中性粒分离液)		200ml
B	样本稀释液	2010C1119	200ml
C	清洗液 (赠品)	2010X1118	200ml
D	红细胞裂解液 (赠品)	NH4CL2009	100ml
E	红细胞沉降液 (6%羟乙基淀粉) (赠品)	HES-TBD550-80	80ml
F	细胞分离专用抗凝剂 (赠品)	TBDTM-0050	100ml
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. 抗凝剂的选择

本产品需用枸橼酸钠抗凝剂或本试剂盒随货赠的负压采血管配合使用

在动物实验采血时, 很多实验者选择医用真空采血管获得抗凝血, 医用采血管中的抗凝剂只考虑血浆质量, 但不利于高纯度细胞分离实验。

为此, 天津灏洋特别开发出专用实验动物抗凝剂及抗凝管专用于细胞分离, 改变使用普通采血管获得抗凝血分离效果不佳, 提取率及纯度低下的不良结果。

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



细胞分选/富集试剂盒说明书合集

www.tbdscience.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	TBD™ 细胞分离专用抗凝剂(随试剂盒 附赠 100ml 装: 1 瓶)	TBDTM-0050	100ml
2		TBDTM-0200	200ml
3		TBDTM-0500	500ml
4	TBD™ 实验动物一次性使用负压采血管	TBDTM-0001	5ml/支

3. 无菌离心管(少量血液样本专用离心管)

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

4. 目的细胞最佳分离时间

血液离体后 2 小时内。如达不到 2 小时内分血条件，请务必于 4 小时内进行分血步骤，超过 4 小时很难顺利进行分离。

血液离体时间	分离效果
2 小时内	最佳
2-4 小时	可接受
4-6 小时	细胞活性下降，分离效果不佳
6 小时以上	分离效果极差，直至分离不出细胞

5. 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 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。

6. 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。

制备抗凝血液，抗凝剂与全血体积比为 1:1。

(注：抗凝剂使用比例不宜过低，否则影响分离效果)





根据样本量大小，分以下两种情况：

情况A：血液样本量0.5-1.0ml时，实验方法如下：

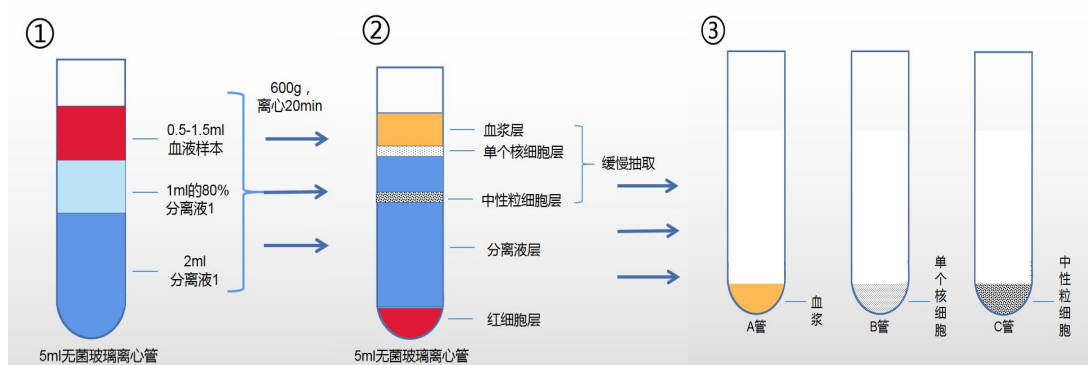
1. 取一支 5ml 无菌玻璃离心管 (TUB: 2016)，加入 2ml 分离液 1，后缓慢加入 1ml 的 80% 浓度的分离液溶液(分离液 1: 样本稀释液=4: 1 的混合液)，形成梯度界面。
2. 制备血液样本：抗凝血液与红细胞沉降液按 2: 1 比例混匀后，小心加于分离液梯度界面之上，600g，离心 20min (使用 5ml 无菌玻璃离心管，可能需要使用 50ml 的 PBMC 高效离心管)。

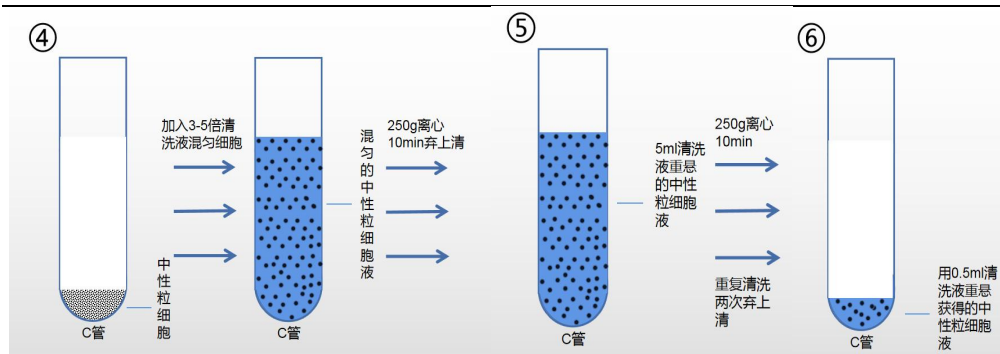
注：1.两层分离液添加完成后，需要在 1min 内添加血液样本。

2.单只小鼠细胞量为 2×10^8 - 1×10^9 ，分离细胞时需要使用 5ml 无菌玻璃离心管。

3. 离心后，离心管中的血浆层下面将出现两层环状乳白色细胞层，上层细胞为 (大/小鼠) 单个核细胞层，下层细胞为 (大/小鼠) 中性粒细胞层。
4. ①小心吸取血浆层转移到新离心管 A 中备用 (分离效果不理想，可进行后续处理方案)
②小心吸取离心管中的单个核细胞层转移到新离心管 B 中。
③小心吸取离心管中的中性粒细胞层转移到新离心管 C 中。
5. 向含有中性粒细胞离心管 C 中，加入 3-5 倍体积清洗液 (产品编号：2010X1118)，混匀细胞后，250g，离心 10min，弃去上清。
6. 用吸管吸取 5ml 清洗液 (产品编号：2010X1118) 重悬所的细胞，250g，离心 10min，弃去上清。
7. 重复清洗两次，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





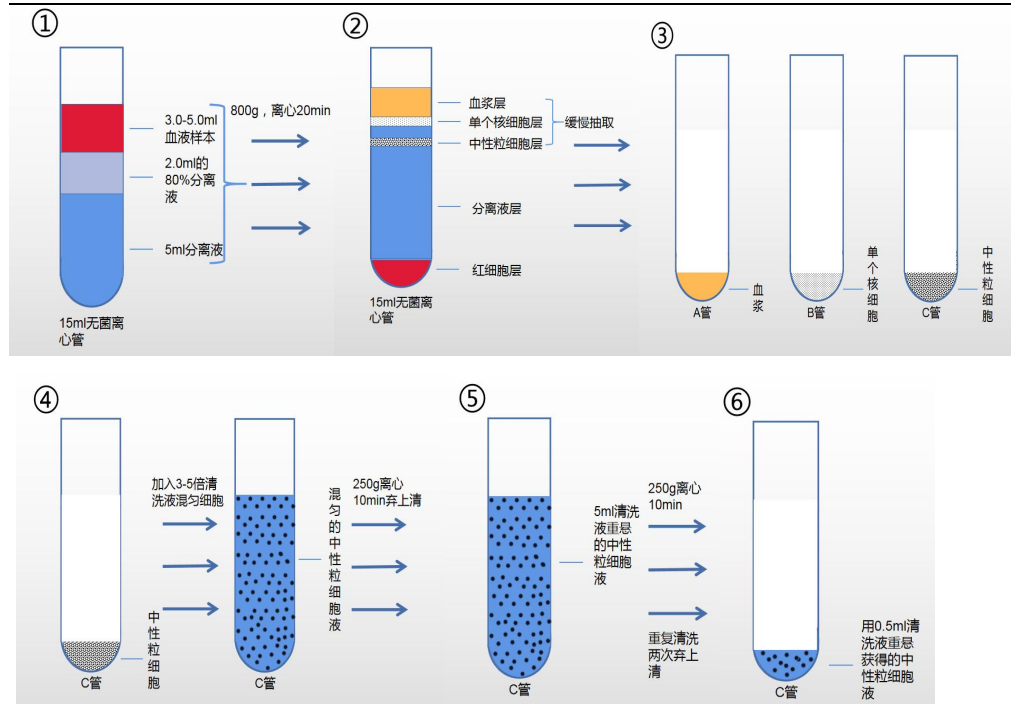
情况B：血液样本量1.0-2.0ml时，实验方法如下：

1. 取一支 15ml 无菌离心管，加入 5ml 分离液 1，后缓慢加入 2.0ml 的 80%浓度的分离液溶液(分离液 1：样本稀释液=4：1 的混合液)，形成梯度界面。
或（取一支 10ml 无菌硅化离心管（TUB：2015），加入 3ml 分离液 1，后缓慢加入 2ml 的 80%浓度的分离液溶液(分离液 1：样本稀释液=4：1 的混合液)，形成梯度界面。）
2. 制备血液样本：抗凝血液与红细胞沉降液按 2：1 比例混匀后，小心加于分离液梯度界面之上（分离液加入量不得少于血液样本加入量，血液样本较多时按比例增加分离液和分离液溶液，并更换合适离心管），800g，离心 20min。

注：1.两层分离液添加完成后，需要在 1min 内添加血液样本。

3. 离心后，离心管中的血浆层下面将出现两层环状乳白色细胞层，上层细胞为（大/小鼠）单个核细胞层，下层细胞为（大/小鼠）中性粒细胞层。
4. ①小心吸取血浆层转移到新离心管 A 中备用（分离效果不理想，可进行后续处理方案）
②小心吸取离心管中的单个核细胞层转移到新离心管 B 中。
③小心吸取离心管中的中性粒细胞层转移到新离心管 C 中。
5. 向含有中性粒细胞离心管 C 中，加入 3-5 倍体积清洗液（产品编号：2010X1118），混匀细胞后，250g，离心 10min，弃去上清。
6. 用吸管吸取 5ml 清洗液（产品编号：2010X1118）重悬所的细胞，250g，离心 10min，弃去上清。
7. 重复清洗两次，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。

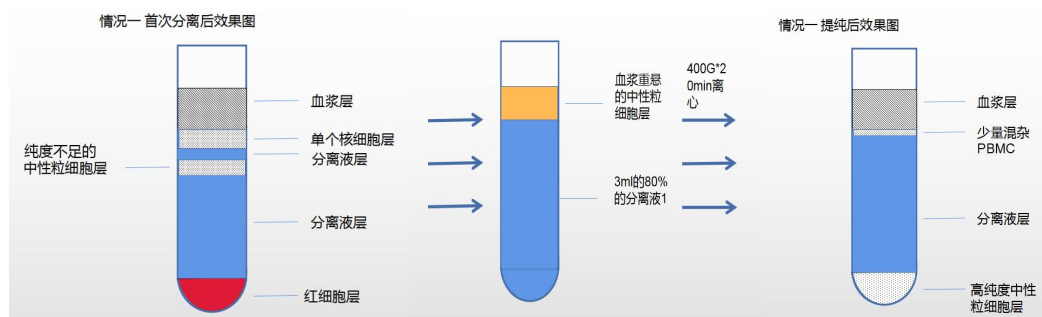
分离图例



【分离过程中可能出现的情况及处理方案】

情况一：可见单个核细胞层和中性粒细胞层两层细胞（如果中性粒细胞纯度<70%提纯方法如此步骤）

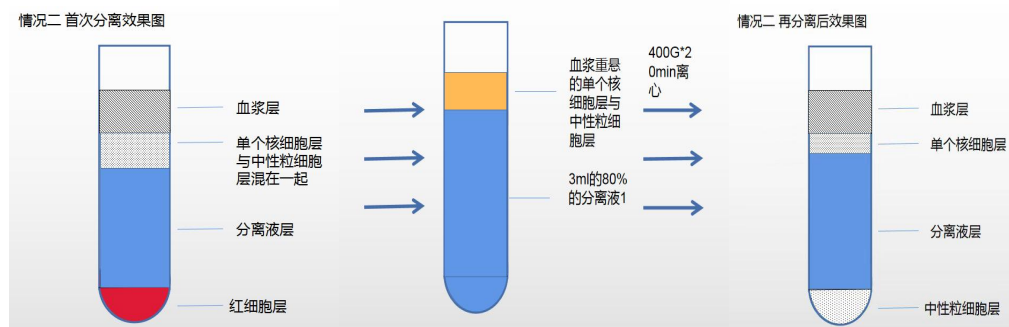
1. 取中性粒细胞层，清洗后用备用的血浆1-2ml重悬细胞。
2. 使用分离液1提纯（80%浓度的分离液1（分离液1：样本稀释液=4：1的混合液））。
 - a. 取10ml无菌硅化离心管，加入3ml的80%分离液1，将用血浆重悬的1-2ml中性粒细胞层细胞缓慢加于分离液之液面上，400g，离心20min。
 - b. 离心后，离心管底部细胞即为高纯度中性粒细胞，纯度可达90%以上。
 - c. 可重复检验方法中的目的细胞洗涤方法，获得高纯度中性粒细胞。





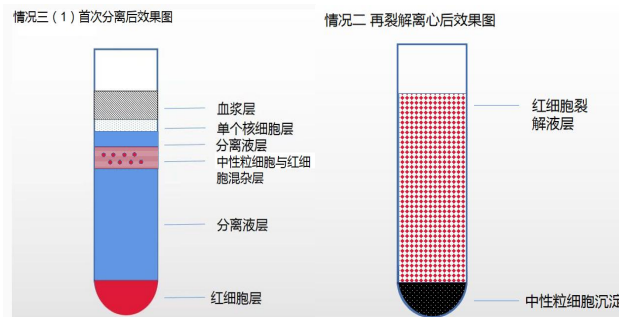
情况二：单个核细胞层和中性粒细胞层混在一起不能分开

1. 吸取全部白色环状细胞层，清洗后用备用的血浆1-2ml重悬细胞。
2. 使用分离液 1 提纯（80%浓度的分离液 1(分离液 1：样本稀释液=4：1 的混合液)）。
 - a. 取10ml无菌硅化离心管，加入3ml的80%分离液1，将用血浆重悬的1-2ml细胞缓慢加于分离液之液面上，400g，离心20min。
 - b. 离心后，离心管底部细胞即为中性粒细胞。
 - c. 可重复检验方法中的目的细胞洗涤方法，获得中性粒细胞。



情况三(1)：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10ml无菌硅化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（具体方法见“红细胞裂解液使用说明”）即得目的细胞。
- 参考红细胞裂解液说明书（附后）操作。少时多次裂解后获得中性粒细胞。



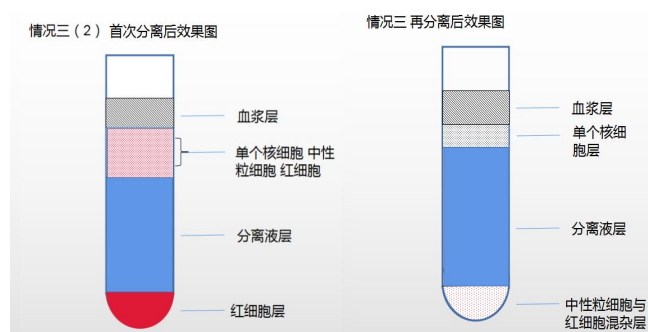
情况三(2)单个核细胞、中性粒细胞、红细胞，三种细胞完全混杂

1. 吸取混杂层，清洗后用备用的血浆1-2ml重悬细胞。
2. 使用分离液 1（80%浓度的分离液溶液(分离液 1：样本稀释液=4：1 的混合液)），重新提取红细胞与中性粒细胞混杂层。



- 取 10ml 离心管，加入 3ml 的 80%分离液 1，将用血浆重悬的 1-2ml 中性粒细胞与红细胞混杂层缓慢加于分离液之液面上，400g，离心 20min。
- 离心后，离心管底部细胞即为中性粒细胞与红细胞混杂层。
- 取10ml无菌硅化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。

参考红细胞裂解液说明书（附后）操作，少时多次裂解后获得中性粒细胞。



【注意事项】

- 全过程样本、试剂及实验环境均需在 $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ （夏季 20°C ，冬季 $22-25^{\circ}\text{C}$ ）的条件下进行。为获得最佳的实验结果，最好在取血 2h 内进行实验，血液存放时间越长，细胞分离效果越差。血液放置超过 6h 后分离效果更差甚至不能达到分离目的。
- 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。
- 分离液用量大于血液样本时，分离效果更佳。
- 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。
- 请勿使用具有红细胞保护成分的抗凝剂，否则影响分离效果（离心后，红细胞不能完全沉至离心管底部）。
- 如分离的目的细胞是中性粒细胞，则抗凝血制备时，抗凝剂用量要是适量增加。

【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°C 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%。

下表为大（小）鼠外周血中各种细胞的数量及比例，用户可适当进行参考（参考百度文库）。



	红细胞	白细胞			血小板
含量 (个/ μL)	$(10.6 \pm 0.4) \times 10^3$	$(2.6 \pm 0.9) \times 10^3$			$(1157 \pm 123) \times 10^3$
		中性粒细胞	淋巴细胞	单核细胞	
		20%-30%	50%-70%	3%-8%	

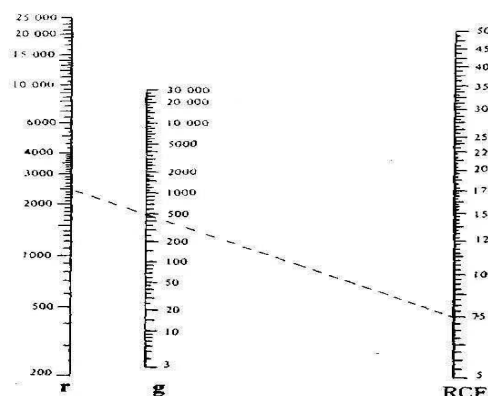
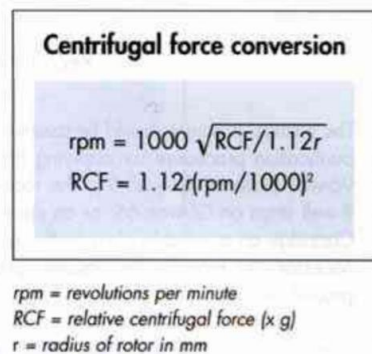
【可能存在的问题及解决方法】

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. 离心力公式及单位换算

单位 rpm 与 g 的换算:



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。



细胞分选/富集试剂盒说明书合集

www.tbdscience.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

扫码观看教学视频



大（小）鼠外周血中性粒细胞分离教学视频



两种分离液叠加视频教学