

鱼脏器组织单核细胞分离液试剂盒

产品货号：BA3241

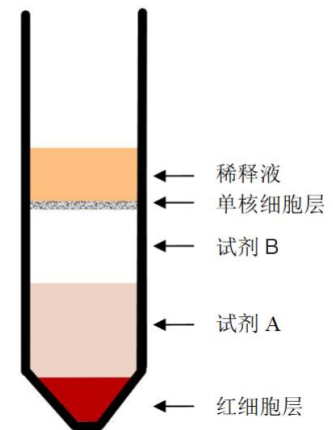
产品规格：200ml/KIT

产品内容：

产品组成	200ml/KIT	保存条件
试剂A	200mL	室温，避光
试剂B	200mL	室温，避光
全血及组织稀释液	200mL	室温，避光
细胞洗涤液	200mL	室温，避光

操作步骤：

1. 制备脏器组织的单细胞悬液。
2. 取一支无菌离心管，先加入试剂A，再加入试剂B，使两者形成梯度界面（试剂A：试剂B的体积比为3：2，如细胞悬液的体积小于5ml，则先后加入3ml试剂A和2ml试剂B；如细胞悬液的体积大于5ml，试剂总量与细胞悬液量相等），两种试剂的分层一定要清晰。
3. 将细胞悬液平铺到分离液液面上方，注意保持两液界面清晰。（可以使用巴氏德吸管吸取细胞悬液，然后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）。
4. 室温，水平转子500~800g，离心20~30min（样本的体积越大所需的离心力越大，离心时间越长，最佳的分层条件需自行摸索，离心转速最大不超过1000g）。
5. 离心后将出现明显的分层：第一层为稀释液层；第二层为白色单核细胞层；第三层为透明试剂B液层；第四层为半透明试剂A液层；第五层为红细胞层（如图示）。
6. 小心吸取第二层乳白色细胞层和第三层试剂B层到另一无菌的15ml离心管中，加入10mL细胞洗涤液或PBS，颠倒混匀，250g，离心10min。
7. 弃上清，5mL的细胞清洗液或PBS重悬细胞，250g，离心10min。
8. 重复步骤7。
9. 弃上清，细胞重悬备用。
10. 差异贴壁法纯化细胞：用单核细胞培养基以 10^6 个/ml的密度重悬细胞，将细胞铺于细胞板或细胞瓶中，置于细胞培养箱中进行贴壁培养。
 - 1) 2~4h内贴壁的为单核细胞。
 - 2) 10~24h内贴壁的单个核细胞为内皮、内皮祖细胞、干细胞。
 - 3) 不贴壁的为淋巴细胞。



分层示意图

根据不同细胞的贴壁时间存在差异，以达到简单纯化单核细胞的目的。此法成本低，操作简便。如需获得高纯度的目的细胞则需选用免疫磁珠分选或者是应用流式技术分选细胞。

脏器组织单细胞悬液的制备方法

脏器组织研磨的方法：

1. 无菌条件下摘取脏器组织，撕去脏器被膜，用眼科剪将脏器组织剪成小块。
2. 将尼龙筛网或者是细胞过滤筛放置于平皿上，加入少量全血及组织稀释液（保证脏器组织及获得的细胞处于液体环境中）。
3. 将脏器组织放置于筛网上，使用注射器活塞或者是无菌镊子来研磨脏器组织（尽量控制研磨力度，保持筛网悬空，避免在皿底上直接研磨而造成大批细胞死亡）。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

QQ: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

4. 研磨完全后使用全血及组织稀释液冲洗筛网，收集细胞悬液，再经滤网过滤。

注：

- A. 可用酶消化法，使用胶原酶对脏器组织进行消化，得到单细胞悬液。
B. 如果最终得到的细胞需要培养，那全过程所需试剂与器材均要求无菌。
C. 根据脏器组织的体积控制单细胞悬液的浓度在 $10^8 \sim 10^9$ 个/mL。

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. 分离液使用时应始终保持室温（18~25℃），如室内温度较低，可将分离液预热。4℃或者是温度较低条件下离心，可能会导致白膜层中红细胞污染加重。
3. 血液样本最好为新鲜的抗凝血（采血2h以内），为保持单核细胞的活性，应避免冷冻和冷藏。
4. 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。
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。
6. 血液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，摸索最佳的分离条件。
7. 吸取过多的单核细胞层及分离液层会导致分离液交界处的粒细胞被吸出从而使混杂的粒细胞数量增加；吸取过多的血浆层可能会导致单核细胞中血浆蛋白及血小板污染。
8. 如果要进一步对分离的细胞进行培养，那在收集血液和分离过程中，注意无菌操作，避免微生物污染。
9. 不同动物血液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。

保存条件：

本产品对光敏感，应该室温避光储存，保质期2年。无菌开封后，保存于室温。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com