

## 各种动物骨髓中性粒细胞分离液试剂盒

规格：200 mL/kit

保存：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。

试剂盒组成：

试剂盒组分	规格	保存条件
试剂 A	200mL	室温避光
试剂 C	100mL	室温避光
细胞洗涤液	200mL	室温
红细胞裂解液	100mL	室温
全血及组织稀释液	200mL	室温

操作步骤（仅供参考）：

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）。

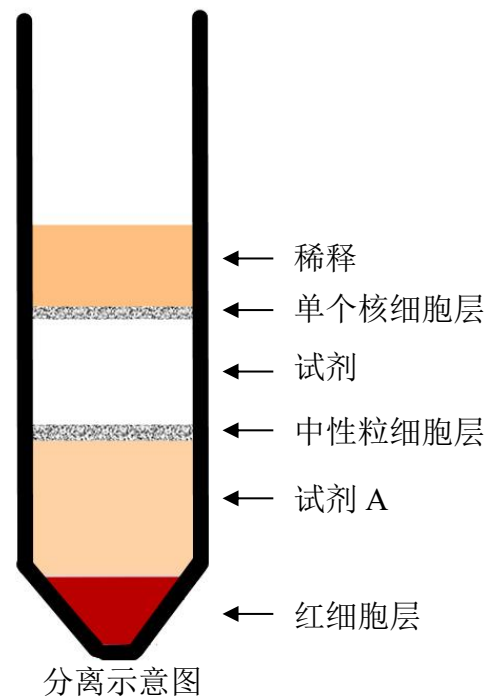
4、离心后，离心管中将出现两层环状乳白色细胞层，上层细胞为单个核细胞层，下层细胞为中性粒细胞层，如图所示（个体差异或者是分离条件不同，粒细胞层可分离不明显）。

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。



分离示意图

## 骨髓单细胞悬液的制备方法 (仅供参考)

### 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者是1XPBS稀释液，冲洗骨髓腔以获得骨髓。
- 3、最终制备成 $2 \times 10^8 - 1 \times 10^9$ /ml 的骨髓单细胞悬液备用。

### 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 $2 \times 10^8 - 1 \times 10^9$ /ml 的单细胞悬液备用。

### 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：穿刺部位是股骨内侧、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，避免微生物污染。。
- 2、分离液使用时应始终保持室温（18°C~25°C），如室内温度较低，可将分离液预热。4°C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、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、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。
- 5、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。
- 6、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。