



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

“XXXX”动物脾脏组织白细胞分离液实验方法

技术文档编号: TBD0033SOP

【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	XXXX 动物脾脏组织白细胞分离液		200ml
B	样本稀释液 (赠品)	2010C1119	200ml
C	清洗液 (赠品)	2010X1118	200ml
D	匀浆冲洗液 (赠品)	F2013TBD	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

2. 无菌硅化离心管 (小量样本专用)

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

【组织样本的制备】

1. 取组织块称重后, 用眼科剪刀无菌操作, 将脾脏剪成小块。
2. 将组织块放在 70 μ m 细胞筛网 (产品编号: TBDTM-SC, 随试剂盒附赠 5 个) 上, 用研磨器反复研磨, 边研磨边加入匀浆冲洗液 (以 0.1g 组织为例, 约加 5-8ml), 使细胞全部通过筛网滴到离心管中。
3. 弃去筛网, 组织研磨液经 450g, 离心 10min, 弃上清。
4. 用样本稀释液重悬组织细胞, 将细胞悬液细胞浓度调整为 $2 \times 10^8 - 1 \times 10^9$ /ml (以 0.1g 组织为例, 约使用 1ml 样本稀释液重悬细胞), 备用。

【检验方法】

全过程样本、试剂及实验环境均需 在 20 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C 的条件下进行。



TBD

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

1. 取一支离心管，加入与脾脏组织单细胞悬液等量的分离液（注：分离液最少不得少于 3ml）。
2. 用吸管小心吸取脾脏组织单细胞悬液加于分离液液面上，500-800g，离心 20-30min。（注：根据脾脏组织单细胞悬液样本量确定离心条件，脾脏组织单细胞悬液量越大，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. 离心后用吸管小心吸取所有环状乳白色细胞层（一层或两层），加入 10 ml 清洗液（产品编号：2010X1118），混匀细胞。250g，离心 10min。重复洗涤 2-3 次，即得所需白细胞。
4. 如有红细胞残留请使用红细胞裂解液（产品编号：NH₄CL2009）裂解红细胞，具体操作方法详见“红细胞裂解液使用说明”。

【注意事项】

1. 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。
2. 本实验最好不要使用高聚合材质（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。
3. 分离液用量大于脾脏组织单细胞悬液样本量时，分离效果更佳。
4. 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）】

本实验白细胞提取率及纯度大于 80%。

【相关实验技术方案】

1. 脾脏组织单细胞悬液制备技术。
2. 所获得白细胞的培养技术。
3. 所获得白细胞的核酸提取技术。
4. 所获得白细胞的鉴定方法

- A.流式细胞技术
- B.免疫组化技术
- C.原位杂交技术
- D.PCR 技术

注：上述技术方案详情请登陆本公司官网：www.tbdsience.com，搜索“天津灏洋细胞分离、纯化、扩增、鉴定及生物治疗技术手册”，并在说明书项目栏下下载使用。

【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。