

## 各种动物骨髓中性粒细胞分离液试剂盒

规格：200 mL/kit

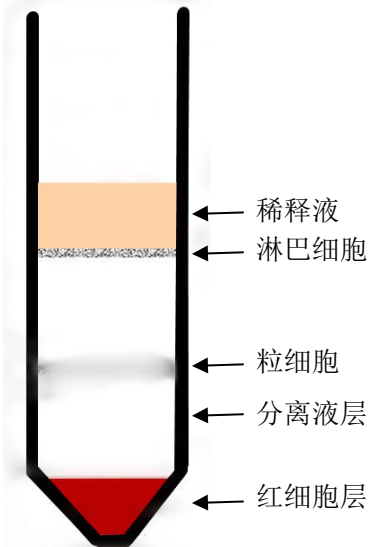
保存：本产品对光敏感，应该室温避光储存，保质期2年。无菌开封后，保存于室温。

组成：

各种动物骨髓中性粒细胞分离液	200mL
细胞洗涤液	200mL
全血及组织稀释液	200mL
红细胞裂解液	100mL

操作步骤：

1. 制备骨髓的单细胞悬液。
2. 在离心管中加入适量分离液（细胞悬液体积小于5mL时，加入5mL分离液；大于等于5mL，加入等体积分离液。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. 离心后将出现明显的分层：最上层是稀释液；稀释液与分离液之间是淋巴细胞层；分离液中为粒细胞层（个体差异或者是分离条件不同，粒细胞层可能分离不明显）；最下层为红细胞层。
5. 小心的吸取分离液层到15mL洁净的离心管中，10mL PBS或细胞洗涤液洗涤白膜层细胞。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

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，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用活体穿刺方法：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 $2 \times 10^8 - 1 \times 10^9/\text{ml}$  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：

- A. 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。
- B. 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。
- C. 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。
- D. 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。
- E. 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。
- F. 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。

### 参考文献

1. Boyum A. Separation of leucocytes from blood and bone marrow. Scand J Clin Lab Invest Suppl. 1968; 97: 7.
2. Ting A, Morris PJ. A technique for lymphocyte preparation from stored heparinized blood. Vox Sang. 1971 Jun; 20(6): 561-3.
3. Boyum A. Separation of Blood Leucocytes, Granulocytes and Lymphocytes Tissue Antigens. 1974; 4(4): 269-74.
4. Weisbart RH, Webb WF, Bluestone R, Goldberg LS. A simplified method for lymphocyte separation. Vox Sang. 1972; 23(5): 478-80.
5. Recalde HR. A simple method of obtaining monocytes in suspension. J Immunol Methods. 1984 Apr 13;69(1):71-7.
6. Bøyum A, Løvhaug D, Tresland L. Separation of leucocytes: improved cell purity by fine adjustments of gradient medium density and osmolality. Scand J Immunol. 1991 Dec; 34(6):697-712.
7. Harris R, Ukaejiofo EO. Tissue typing using a routine one-step lymphocyte separation procedure. Br J Haematol. 1970 Feb; 18(2):229-35.