

人外周血造血干细胞分离液试剂盒

货号: P8690

规格: 3×200ml/kit

保存: 室温避光储存, 有效期至少2年。

产品说明:

外周血造血干细胞分离液	200ml
样本稀释液	200ml
清洗液	200ml

检验方法:

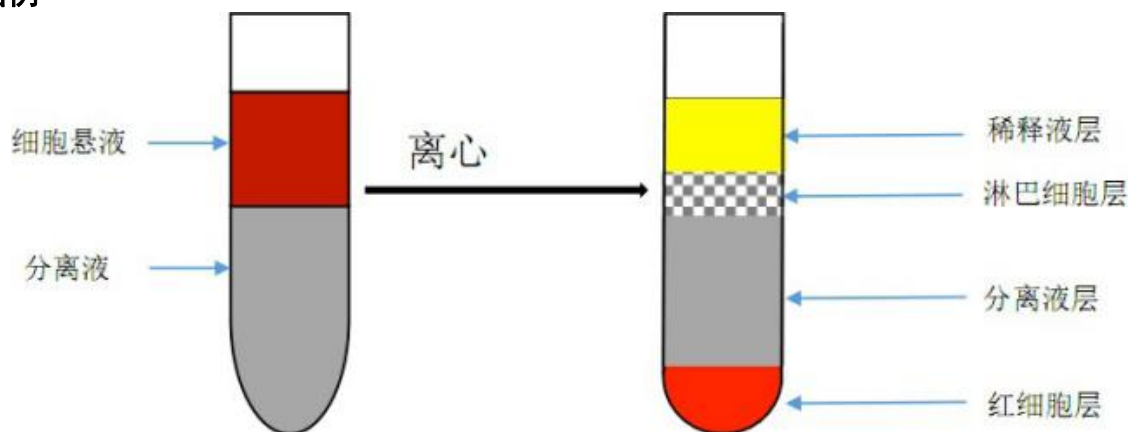
全过程样本、试剂及实验环境均需在 $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的条件下进行。

首先取抗凝血按体积比1:1的比例加样本稀释液混匀, 根据稀释后的样本量大小, 分以下两种情况:

情况A: 稀释后的血液样本量小于5ml时, 实验方法如下:

1. 取一支15ml离心管, 加入与稀释后样本等量的分离液。(注: 分离液最少不得少于3ml)。
2. 用吸管小心吸取脾脏组织悬液样本加于分离液液面上, 400-550g, 离心20-30min (注: 根据血液样本量确定离心条件, 悬液样本量越多, 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, 此时离心管中由上至下分为四层。第一层为稀释液层。第二层为环状乳白色目的细胞层。第三层为透明分离液层。第四层为红细胞层。
4. 用吸管小心吸取第二层环状乳白色细胞层到另一15ml离心管中, 往所得离心管中加入10ml清洗液, 混匀细胞。
5. 250g, 离心10min。
6. 弃上清。
7. 用吸管以5ml清洗液重悬所得细胞。
8. 250g, 离心10min。
9. 重复6、7、8, 弃上清后以0.5ml后续实验所需相应液体重悬细胞。

分离图例



情况B：稀释后的血液样本量大于等于5ml 时，实验方法如下：

1. 取一支适当的离心管，先加入与稀释后样本等量的分离液。
2. 将经稀释后的血液样本小心加于分离液之液面上，450-650g（最大离心力可至1000g），离心20-30min。（注：根据血液样本量确定离心条件，血液量越多，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。加入血液样本后，样本及分离液总体积不得超过离心管总体积的三分之二）。
3. 剩余步骤同“情况A”中步骤3 至步骤9。

差异贴壁法纯化细胞

（1）用干细胞无血清培养基或干细胞完全培养基以 $1.5-3 \times 10^6$ 个/ml的密度重悬细胞，将细胞铺于一次性细胞板或细胞瓶中，放于37°C二氧化碳培养箱中进行贴壁培养。

（2）2-4小时内贴壁的为巨噬细胞前体（俗称为单核细胞）。

（3）10-24小时内贴壁的单个核细胞为内皮、内皮祖细胞、干细胞。

（4）不贴壁的为淋巴细胞。

注：

- a) 无血清培养基中不含任何动物成分，为得到更佳培养效果可添加10%自体血浆或2-8%胎牛血清。
- b) 完全培养基中含2-20%胎牛血清（血清具体含量由所培养的目的细胞而定）。
- c) 由于每种细胞的贴壁时间存在差异可将所得细胞分开已达简单的纯化目的，此法成本相对较低。如需获得高纯度目的细胞则需在使用分离液后选用免疫磁珠阳性或阴性分选。

注意事项：

1. 全过程样本、试剂及实验环境均需在 $20 \pm 2^\circ\text{C}$ 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. 吸取过多的目的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。
4. 分离液用量大于稀释后血液样本时，分离液效果更佳。