

大（小）鼠外周血 NK 细胞分离液实验方法

【产品规格】

2×200ml/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	分离液 1		200ml
B	分离液 2		200ml
C	清洗液（赠品）	2010X1118	200ml
D	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。

（离心机使用时调整为慢升慢降（具体参数请咨询离心机厂家）建议升速（指开始启动→达到设定离心力）的时间、降速（指设定离心时间完成→机器完全停止）时间均控制在 3 分钟左右。）

2. 抗凝剂的选择

在动物实验采血时，很多实验者选择医用真空采血管获得抗凝血，医用采血管中的抗凝剂只考虑血浆质量，但不利于高纯度细胞分离实验（或必须使用枸橼酸钠的医用真空抗凝采血管）。

为此，天津灏洋特别开发出专用实验动物抗凝剂及抗凝管专用于细胞分离，改变使用普通采血管获得抗凝血分离效果不佳，提取率及纯度低下的不良结果。

序号	产品名称	产品货号	规格
1	TBD™ 细胞分离专用抗凝剂	TBDTM-0050	100ml
2		TBDTM-0200	200ml
3		TBDTM-0500	500ml
4	TBD™ 实验动物一次性使用负压采血管（随试剂盒附赠 5 支）	TBDTM-0001	5ml/支

3. 无菌离心管(少量血液样本专用离心管)

序号	产品名称	产品货号	规格
1	无菌玻璃离心管/5mL(随试剂盒附赠 5 支)	TUB2016	100 支/包
2	无菌硅化离心管/10mL(随试剂盒附赠 5 支)	TUB2015	100 支/包

4. 目的细胞最佳分离时间

血液离体后 2 小时内。如达不到 2 小时内分血条件，请务必于 4 小时内进行分血步骤，超过 4 小时很难顺利进行分离。

血液离体时间	分离效果
2 小时内	最佳
2-4 小时	可接受
4-6 小时	细胞活性下降，分离效果不佳
6 小时以上	分离效果极差，直至分离不出细胞

5. 分离液的使用环境

- 分离液需常温（37℃-15℃）避光保存，严禁冷藏冷冻保存；
- 使用时严格遵守无菌操作规范（超净工作台或生物安全柜内），并在 18℃-22℃ 环境温度下进行操作，20℃ 条件下分离效果最佳。超出此温度范围，有可能使分离液密度发生改变，造成分离效果不佳。

6. 参考值（目的细胞参考范围）

本试剂盒可保证目的细胞的提取率大于 80%，不是纯度。如需获得高纯度目的细胞，请配合免疫磁珠分选。本试剂盒可减少磁珠的使用量，减少成本。

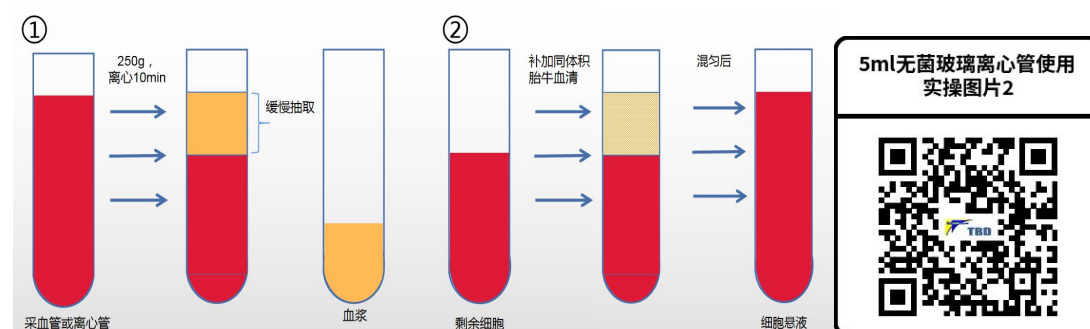
【检验方法】

全过程样本、试剂及实验环境均需在 20±2℃（试剂需要复温。夏季 20℃，冬季 23℃。）的条件下进行。

血液稀释方法：1 份的 PBS 或样本稀释液(产品编号：2010C1119 需另购)加 2 份的血液进行稀释（PBS:抗凝血=1:2）；

注：稀释液要求：用不含钙镁离子的缓冲液或培养基进行血液稀释。

血浆留存方法：首先取抗凝血，250g，离心 10min，抽取血浆留存备用。补加胎牛血清(添加量与留存血浆量等同) 制成细胞悬液，根据细胞悬液液体体积，选择适当离心管进行试验。



根据血液样本，分以下两种情况：

情况 A：血液样本量 0.5-1.5ml 时，实验方法如下：

1. 取一支 5ml 无菌玻璃离心管（货号：TUB2016），先加入 2ml 分离液 1，后缓慢加入 1ml 的分离液 2，形成梯度界面。再缓慢加入 0.5-1.0ml 血液样本（新鲜抗凝血或细胞悬液）。血液样本小心加于分离液液界面之上。（分离液总量不得少于 2ml，血液样本不得少于 0.5ml）

或（取一支 10ml 无菌硅化离心管（货号：TUB2015），先加入 3ml 分离液 1，后缓慢加入 1.5ml 的分离液 2，形成梯度界面。再缓慢加入 0.5-1.5ml 血液样本（新鲜抗凝血或细胞悬液）。血液样本小心加于分离液液界面之上。（分离液总量不得少于 4ml，血液样本不得少于 0.5ml）

2. 以 450g，离心 30min。（注：如改变血液样本及分离液用量，需相应调整离心力及离心时间；如使用 5ml 无菌玻璃离心管，可能需要使用 50ml 的 PBMC 高效离心管。）

3. 离心后，离心管中由上至下分为六层。第一层为血浆层。第二层环状乳白色为（大/小鼠）NK 细胞层（第一层白环及上层 50%分离液 2）。第三层环状乳白色为单个核细胞层（下层 50%分离液 2 及第二层白环）。第四层为透明分离液 1 液层。第五层为粒细胞层。第六层为红细胞层。

4. ①小心吸取血浆层转移到新离心管 A 中（分离效果不理想，可进行后续处理方案）。

②小心吸取离心管中的（大/小鼠）NK 细胞层转移到新离心管 B 中。

③小心吸取离心管中的单个核细胞层转移到新离心管 C 中。

5. 向含有（大/小鼠）NK 细胞层离心管 B 中，加入 5-10ml 清洗液（产品编：2010X1118）混匀细胞。

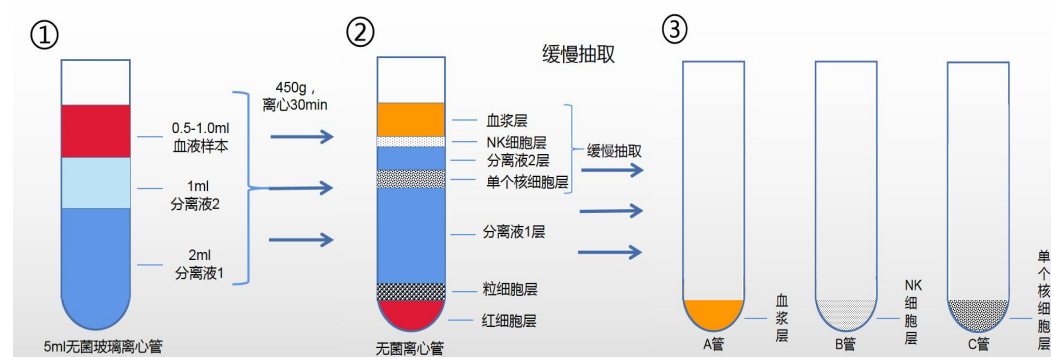
6. 250g，离心 10min。弃去上清。

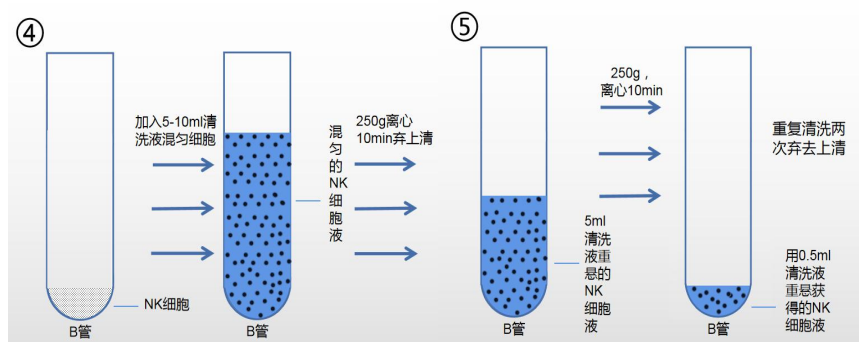
7. 用吸管吸取 5ml 清洗液（产品编号：2010X1118）重悬所得细胞。

8. 250g，离心 10min，弃去上清。

9. 重复清洗两次，弃去上清，用 0.5ml 清洗液（产品编号：2010X1118）或根据下一步实验要求加入相对应液体，重悬所得细胞。

分离图例

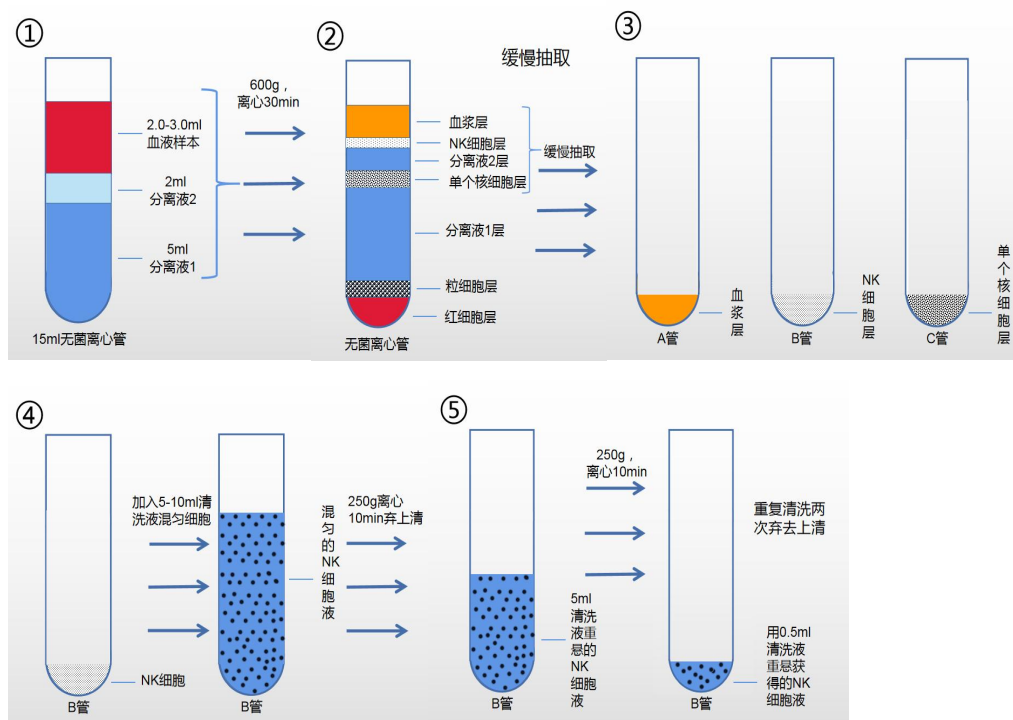




情况 B：血液样本量 2.0-3.0ml 时，实验方法如下：

1. 取一支 15ml 无菌离心管，先加入 5ml 分离液 1，后缓慢加入 2ml 的分离液 2，形成梯度界面。再缓慢加入 2.0-3.0ml 血液样本（新鲜抗凝血或细胞悬液）。血液样本小心加于分离液液界面之上。（总液体量不得超过 2/3）
2. 以 600g，离心 30min。（注：如改变血液样本及分离液用量，需相应调整离心力及离心时间。）
3. 离心后，离心管中由上至下分为六层。第一层为血浆层。第二层环状乳白色为（大/小鼠）NK 细胞层（第一层白环及上层 50%分离液 2）。第三层环状乳白色为单个核细胞层（下层 50%分离液 2 及第二层白环）。第四层为透明分离液 1 液层。第五层为粒细胞层。第六层为红细胞层。
4. ①小心吸取血浆层转移到新离心管 A 中（分离效果不理想，可进行后续处理方案）。
②小心吸取离心管中的（大/小鼠）NK 细胞层转移到新离心管 B 中。
③小心吸取离心管中的单个核细胞层转移到新离心管 C 中。
5. 向含有（大/小鼠）NK 细胞层离心管 B 中，加入 5-10ml 清洗液（产品编：2010X1118）混匀细胞。
6. 250g，离心 10min。弃去上清。
7. 用吸管吸取 5ml 清洗液（产品编号：2010X1118）重悬所得细胞。
8. 250g，离心 10min，弃去上清。
9. 重复清洗两次，弃去上清，用 0.5ml 清洗液（产品编号：2010X1118）或根据下一步实验要求加入相对应液体，重悬所得细胞。

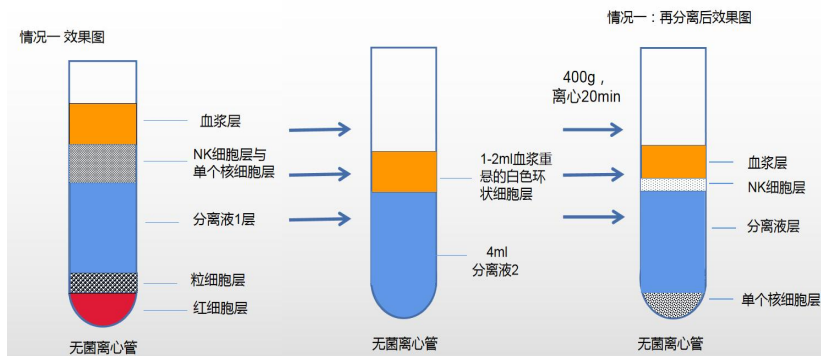
分离图例



【分离过程中可能出现的情况及处理方案】

情况一：NK 细胞层和单个核细胞层混在一起不能分开

1. 吸取全部白色环状细胞层，清洗后用备用的血浆 1-2ml 重悬细胞。
2. 使用分离液 2 重新提取 NK 细胞。
3. 取 15ml 离心管，加入 4ml 分离液 2，将用血浆重悬的 1-2ml 细胞缓慢加于分离液之液面上，400g，离心 20min。
4. 离心后，离心管可分为 4 层，第一层血浆层，第二层 NK 细胞层，第三层分离液层，第四层单个核细胞层。
5. 可重复检验方法中的目的细胞洗涤方法，获得 NK 细胞。



【注意事项】

1. 本实验最好不使用高聚合材质（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。
2. 分离液用量大于血液样本时，分离效果更佳。
3. 如实验后细胞得率或活性过低，请联系技术支持。

【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 NK 细胞提取率大于 80%。

下表为小鼠外周血中各种细胞的数量及比例，用户可适当进行参考。（参考百度文库）

	红细胞	白细胞			血小板
含量（个/ μL ）	$(10.6 \pm 0.4) \times 10^3$	$(2.6 \pm 0.9) \times 10^3$			$(1157 \pm 123) \times 10^3$
		中性粒细胞	淋巴细胞	单核细胞	
		20%-30%	50%-70%	3%-8%	

【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. 离心力公式及单位换算

<http://www.shanjin.com.cn/news/23.html>

-
3. 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。
 4. 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。