



细胞分选/富集试剂盒说明书合集

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

小鼠外周血、组织、脾脏及骨髓淋巴细胞/单个核细胞 分离液试剂盒通用说明书

实验小鼠品系选择：

部分C57小鼠不适用于本试剂盒。

(注：C57 小鼠易出现红细胞沉降不完全，甚至完全不沉降的现象，请慎重选择。)

【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	小鼠淋巴细胞分离液/ 小鼠单个核细胞分离液		200ml
B	PBMC 高效离心管/5ml	601004	10 支/包×2 包
C	说明书		1 份
D	离心适配器（赠送）		2 个
E	实验动物一次性使用负压采血管（赠送）	TBD™-0001	5ml/支×5 支

【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(产品信息详见说明书最后的附页)

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)。



细胞分选/富集试剂盒说明书合集

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

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。

3. PBMC 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

4. 分离液的使用环境

- 分离液需常温（15℃-25℃）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。

5. 参考值（目的细胞参考范围）

本试剂盒可保证**目的细胞的提取率及纯度大于 80%**。如需获得高纯度的 T 细胞或 B 细胞，请配合免疫磁珠分选，进行细胞分离。本试剂盒可减少磁珠的使用量，减少成本。

骨髓单细胞悬液的制备

- 大（小）鼠等小型实验动物以适当方式处死动物，剥离出股骨或胫骨，用剪刀剪断骨头两端，露出内腔。用注射器吸取适量(根据动物大小)的匀浆冲洗液(产品编号：F2013TBD，需要另购)冲洗出内腔中的骨髓。
- 收集骨髓或骨髓悬液到合适离心管中，反复吹打成单细胞悬液，以 70μm 细胞筛网(产品编号：TBDTM-SC，需要另购)过滤。
- 以 450g，离心 10min，弃上清。
- 用 PBS 缓冲液 (产品编号：PB2004Y，需要另购)重悬细胞浓度为 2×10^8 - 1×10^9 /ml 的单细胞悬液备用(以小鼠为例，一般使用 1ml 的 PBS 的缓冲液重悬骨髓细胞)。



细胞分选/富集试剂盒说明书合集

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

脾脏组织单细胞悬液的制备

1. 取组织块称重后，用眼科剪刀无菌操作，将脾脏组织剪成小块。
2. 将组织块放在 70 μ m 细胞筛网(产品编号: TBDM-SC, 需要另购)上，用研磨器反复揉搓，边揉搓边加入匀浆冲洗液(产品编号: F2013TBD, 需要另购)(以 0.1g 组织为例，约加 5-8ml)，使细胞全部通过筛网冲到离心管中。

注：需要让细胞形成单个的细胞悬液冲到离心管中，而不是被研磨挤压到离心管中。

目的：使脾脏组织形成单个的细胞，而不是成团或碎片组织。单个的细胞更易分离。

3. 弃去筛网，组织研磨液经 300-400g，离心 10min，弃去上清。
4. 用 PBS 缓冲液(产品编号: PB2004Y, 需要另购)重悬组织细胞，将细胞悬液细胞浓度调整为 2×10^8 -- 1×10^9 /ml，备用。
(以 0.1g 脾脏组织为例，约使用 0.5-1ml 的 PBS 缓冲液重悬细胞)

注：

- A. 多个动物脾脏组织需要分离时，应逐个单独进行，不可同时混合进行研磨。
- B. 用 PBS 缓冲液(产品编号: PB2004Y, 需要另购)重悬脾脏组织细胞时，以小鼠或大鼠为例，约使用 0.5ml 或 1.0ml 的 PBS 缓冲液重悬细胞。细胞悬液的细胞浓度约为 2×10^8 -- 1×10^9 /ml。
- C. 若发现匀浆冲洗液冲洗的细胞粘度较大，可进行以下处理：
 - ①配置新冲洗液：9 份的匀浆冲洗液加 1 份的胰蛋白酶/EDTA 消化液（产品编号: TE2004Y 需另购）进行稀释，配置为新冲洗液。
 - ②离心管预处理：再研磨开始之前，在离心管中加入 100 μ l-500 μ l 的胎牛血清或本动物种属血清，终止胰蛋白酶/EDTA 消化液的消化。
 - ③再进行 2,3,4 实验步骤即可。



动物脾脏组织单细胞悬液样本制备

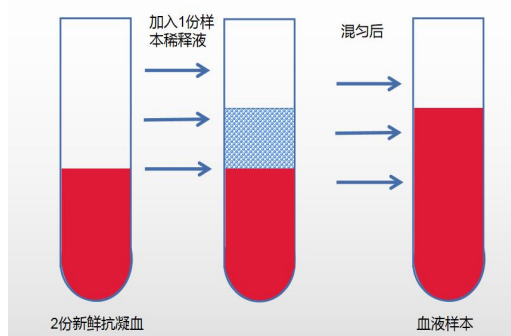


血液样本需要稀释时，实验方法如下：

稀释方法：1 份的 PBS 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。

稀释图例



实验流程：

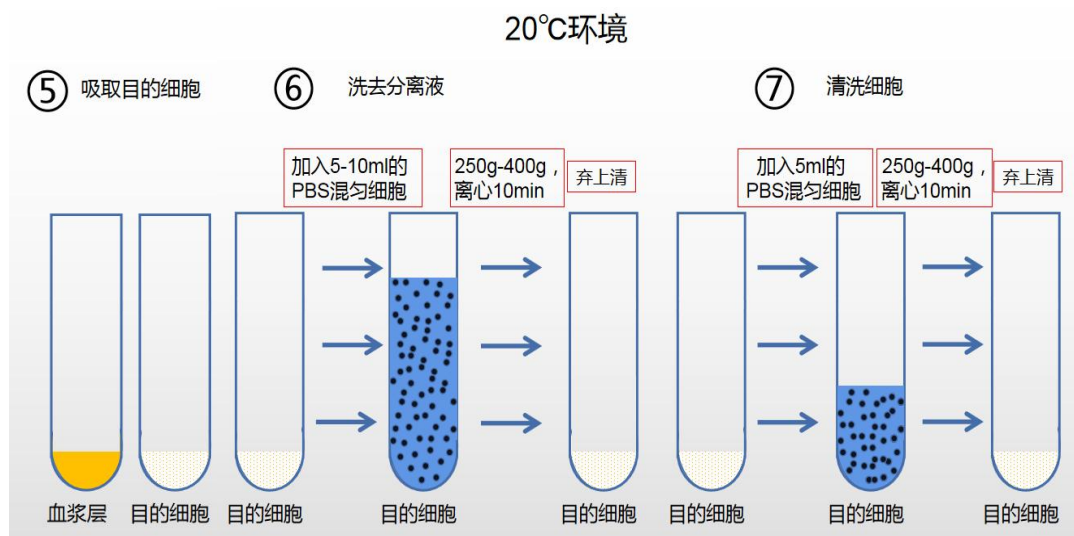
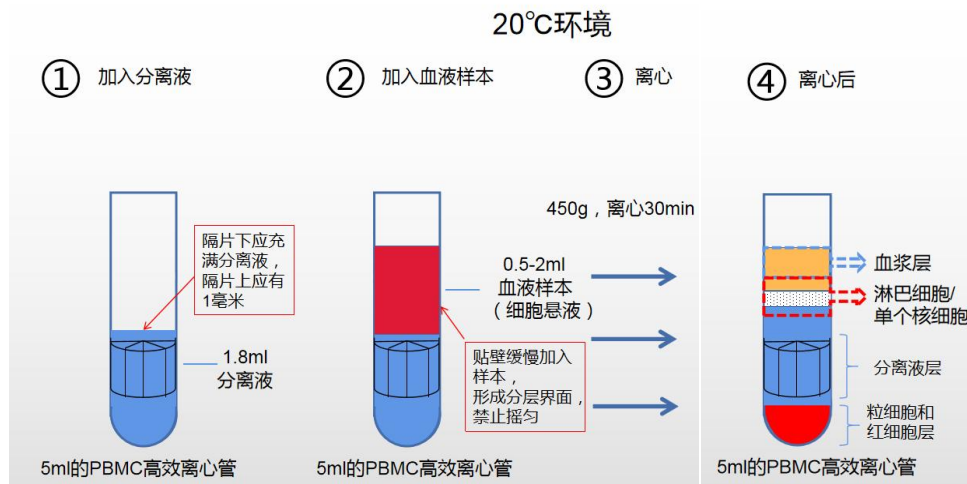
全过程样本、试剂及实验环境均需在 $20 \pm 2^\circ\text{C}$ 的条件下进行。

（试剂需要复温。夏季 20°C ，冬季 25°C 。）

1. 取一支 5ml 的 PBMC 高效离心管（货号：601004），用移液管轻抵隔片，加入 1.8-2.0ml 分离液，确保隔片下充满分离液，且高于隔片 1 毫米（如未至隔片以上，可酌情再加入分离液）。
2. 再缓慢贴壁加入 0.5-2.0ml 血液样本（细胞悬液）。血液样本（细胞悬液）小心加于分离液液界面之上（**禁止摇匀**，尽快放入离心机中，准备离心）。
3. 以 450g，离心 30min。（注：如果没有合适的离心适配器，可能需要使用 50ml 的 PBMC 高效离心管。）
4. 离心后，离心管中由上至下分为四层。第一层为血浆层/稀释液层。第二层为环状乳白色（小鼠）淋巴细胞层/单个核细胞层。第三层为透明分离液层。第四层为红细胞层。
5. ①小心吸取血浆层转移到新离心管中。
②小心吸取离心管中的环状乳白色目的细胞层转移到新离心管中。
6. 向含有目的细胞的离心管中，加入 5-10ml 的 PBS 缓冲液（产品编号：PB2004Y 需另购），混匀细胞。放入离心机中，以 250g-400g，离心 10min，弃去上清。
7. 用移液管吸取 5ml 的 PBS 缓冲液（产品编号：PB2004Y 需另购）重悬所得细胞，放入离心机中，以 250g-400g，离心 10min，弃去上清。
8. 用 0.5ml 的 PBS 缓冲液（产品编号：PB2004Y 需另购）或根据下一步实验要求加入相对应液体，重悬所得细胞。



分离实验流程图例

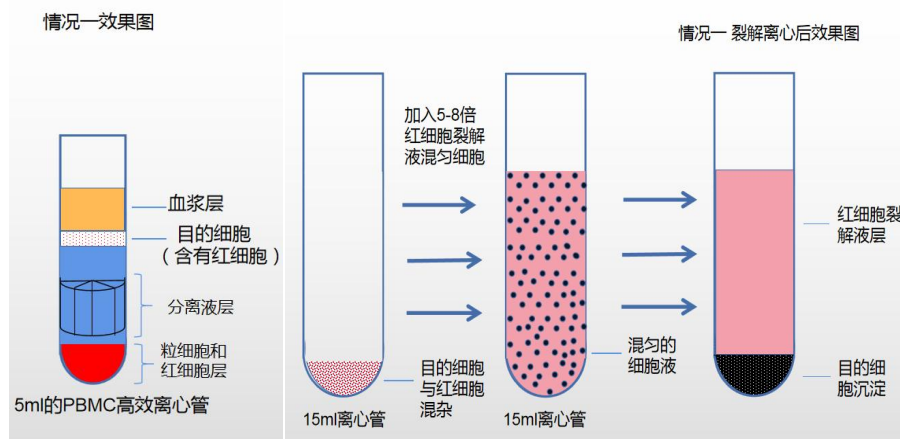


分离过程中可能出现的情况及处理方案

情况一：目的细胞层混杂红细胞

1. 吸取有红细胞混杂的目的细胞层。
2. 取 15 毫升离心管加入红细胞混杂的目的细胞层，根据红细胞残余数量酌情加入 5-8 倍红细胞裂解液。
 - a. 如有红细胞混杂则加入适量红细胞裂解液（产品编号：NH4CL2009 需另购将红细胞裂解即得目的细胞。

(具体方法见“红细胞裂解液使用说明”参考红细胞裂解液说明书操作。少时多次裂解后获得目的细胞。)



【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. 吸取过多的目的细胞层上层溶液会导致血浆蛋白及血小板混杂。
3. 不当的稀释方法会降低细胞得率及活性。稀释液要求：不含钙镁离子的缓冲液或培养基。
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）】

本实验淋巴细胞/单个核细胞提取率及纯度大于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/ μ L)	$(10.6 \pm 0.4) \times 10^3$	$(2.6 \pm 0.9) \times 10^3$			$(1157 \pm 123) \times 10^3$
		中性粒细胞	淋巴细胞	单核细胞	
		20%-30%	50%-70%	3%-8%	



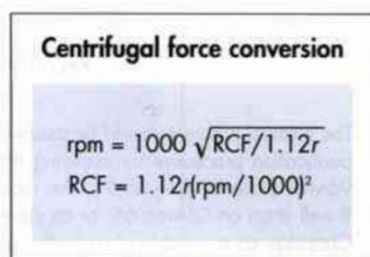
【可能存在的问题及解决方法】

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:

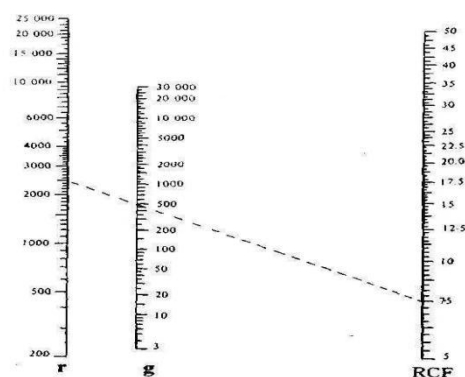
出现情况	出现原因	建议解决方案
离心后目的细胞存在于血浆层或稀释液层	转速过小或离心时间过短	适当增减转速
离心后目的细胞存在于分离液中	转速过大或离心时间过长	
离心后白环层弥散	细胞密度过大	调整细胞密度
离心后白环层太浅或看不见	细胞密度过小	

2. 离心力公式及单位换算

单位 rpm 与 g 的换算:



rpm = revolutions per minute
RCF = relative centrifugal force (x g)
r = radius of rotor in mm



离心速度和离心力的换算

换算法: 在 r 标尺(单位 rpm)上取已知转速, 在 RCF 标尺上取已知的离心半径(单位 cm), 将这两点作一直线相连, 直线所通过的 g 标尺上的交叉点即为相应的离心力。

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



细胞分选/富集试剂盒说明书合集

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

附页

细胞分离实验所需其它耗材

序号	产品名称	用途	产品型号	规格
1	细胞筛网	过滤	TBDTM-SC	
2	无菌玻璃离心管/5mL	洗涤或分离	TUB2016	100 支/包
3	无菌硅化离心管/10mL	洗涤或分离	TUB2015	100 支/包
4	PBMC 高效离心管/50ml	分离	601001	20 支/盒
5	PBMC 高效离心管/15ml	分离	601002	5 支/包
6	PBMC 高效离心管/10ml	分离	601003	50 支/包
7	PBMC 高效离心管/5ml	分离	601004	100 支/包
8	TBDTM 实验动物一次性使用 负压采血管（含抗凝剂）	动物采血	TBDTM-0001	5ml/支

细胞分选试剂盒

序号	产品名称	产品货号	规格
1	小鼠 CD4+T 细胞分选试剂盒	TBD70901	10T-50T-100T
2	小鼠 CD8+T 细胞分选试剂盒	TBD70902	10T-50T-100T
3	小鼠 CD3+T 细胞分选试剂盒	TBD70903	10T-50T-100T
4	小鼠 CD4+T 细胞分选试剂盒（阳选法）	TBD70904	10T-100T
5	小鼠 CD8+T 细胞分选试剂盒（阳选法）	TBD70905	10T-100T
6	人 CD34+细胞分选试剂盒	TBD70906	10T-100T
7	小鼠中性粒细胞分选试剂盒	TBD70907	10T-50T-100T
8	人 CD3+细胞分选试剂盒	TBD71003	10T-50T-100T

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 - 8 -

天津滨海高新区华苑产业区（环外）海泰华科一路 15 号润丰科技 3 幢 5 层

技术服务 Tel: 15822121119 15822691119 13920701119 ◆ Fax:022-58921250 ◆ QQ:2768676807

www.tbdscience.com ◆ E-mail:gx15822121119@163.com

灏洋生物 TBDsciences



细胞分选/富集试剂盒说明书合集

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

细胞分离实验所需其它试剂

(以下试剂均需低内毒素，内毒素高易激活免疫细胞)

序号	产品名称	产品货号	规格
1	PBS 缓冲液	PB2004Y	500ml
2	TBD TM 细胞分离专用抗凝剂		
3	胰蛋白酶/EDTA 消化液	TE2004Y	100ml
4	匀浆冲洗液	F2013TBD	200ml
5	胎牛血清		
6	红细胞裂解液	NH4CL2009	100ml
7	红细胞沉降液(6%羟乙基淀粉)	HES-TBD550	
8	RPMI-1640 培养基	HY1640	500ml

抗凝剂

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 TM 细胞分离专用抗凝剂	TBDTM-0050	100ml
2		TBDTM-0200	200ml
3		TBDTM-0500	500ml