

人全血中性粒细胞分离试剂盒(92-01-0373)

[组分]

人全血中性粒细胞分离冻干混合物, 5 小瓶 : 与单克隆抗体偶联的磁珠

缓冲液 A, 1×12 mL

缓冲液 B, 1×12 mL

[规格] 可处理 5×8 mL 全血。

[储存条件] 2-8 °C 避光保存, 请勿冷冻。有效期见试剂外标签。

[分选原理]

全血中性粒细胞分离试剂盒是为从新鲜抽取的抗凝全血中快速分离未标记的中性粒细胞而开发的, 而无进行密度梯度离心和红细胞裂解。

[试剂和仪器要求]

- 分离器
- 5 mL 聚苯乙烯圆底管或 15mL、50mL 锥形离心管
- (可选) 样品混悬仪
- (可选) 红细胞去除试剂盒
- (可选) 红细胞裂解液
- (可选) 荧光标记的抗体

- (可选) 碘化丙啶溶液或 7-AAD 染色溶液用于流式细胞术排除死细胞。

[步骤]

- ▲ 建议使用 EDTA 作为抗凝剂。使用其他抗凝剂（如肝素或柠檬酸钠）可能会降低目标细胞的产量。
- ▲ 使用前将所有试剂和材料置于室温（19-25 °C）。
- ▲ 轻轻移液，避免形成泡沫。
- ▲ （可选）为了评估目标细胞部分的纯度和回收率，请按方案中的指示取等分样品。

一、试剂准备

- ▲ 每次进行细胞分离前，必须新鲜配制分离混合液。

1. 在一小瓶冻干的全血细胞分离混合液中加入 2 mL 缓冲液 A，复溶冻干的颗粒。上下移动 3-4 次，轻轻混合。每次使用前悬浮液必须均匀，可在 4 °C 下保存一周。
2. 将适当体积的步骤 1 中溶解的颗粒与缓冲液 B 混合，制备分离混合液：处理 1 体积的全血，需要 0.25 体积的复溶颗粒（来自步骤 1）和 0.25 体积的缓冲液 B。
3. 进行磁珠标记。

二、磁珠标记

- ▲下面给出的磁性标记试剂体积为 8ml 全血。当使用较小的体积时，相应减少试剂的体积，例如，用 1ml 分离液配制 2ml 全血，并参考下表了解合适的管尺寸。

全血样本体积	管尺寸
2-3mL	5mL 管
4-8mL	15mL 管

9-20mL	将样品分成几个 15mL 的离心管
21-30mL	50mL 管

1. (可选) 取一份全血进行细胞计数和染色, 以确定起始材料中的目的细胞比例。
2. 用移液管将 8mL 抗凝全血移入 15mL 管中。
3. 在全血中加入 4mL 分离液。
4. 拧紧管子, 轻轻倒转三次。使用样品混悬仪在室温下以大约 12 rpm 的永久运行速度孵育样品 5 分钟。
5. 进行细胞分选。

三、细胞分选

1. 从样品混悬仪中取出装有样品的离心管, 小心地打开盖子。
2. 将打开的离心管放入分离器的磁场中 15 分钟。磁性标记的细胞将附着在管壁上, 而聚集的红细胞则沉积在管底。

▲注意: 分离过程中不要移动离心管。

3. 当离心管仍在分离器内时, 小心地将上清液收集到一个新的 15 mL 离心管中。为获得最佳回收率, 收集上清液时, 将移液管吸头沿离心管前壁自上而下移动。上清液中含有目标细胞部分。

▲注意: 上清液应留有余量 (高出红细胞颗粒约 1-2 毫米), 以免意外吸入红细胞。

4. (可选) 磁性分离后, 取等量上清液用于细胞计数和染色。

四、(可选) 去除残余红细胞

可使用红细胞去除试剂盒通过磁性去除残余红细胞。或者使用红细胞裂解液 (10×) 裂解红细胞。

使用红细胞去除试剂盒磁性去除红细胞

使用红细胞去除试剂盒去除红细胞时，使用“细胞分选”第 3 步的未修饰上清液（即不离心或稀释）。

使用红细胞裂解液裂解红细胞

1. 室温下将含有分离的中性粒细胞的上清液以 $300\times g$ 离心 10 分钟。完全吸出上清液。
2. 用 10 mL $1\times$ 红细胞裂解液重悬细胞颗粒。
3. 按照红细胞裂解液说明书进行操作。

▲（可选）红细胞裂解后，取等量上清液进行细胞计数和染色。

五、（可选）中性粒细胞纯度评估

可通过流式细胞术评估富集中性粒细胞的纯度和回收率。流式细胞分析前应裂解或去除红细胞。