“XX”动物外周血 NK 细胞分离液实验方法

技术文档编号： TBD0038SOP

【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		TBDTM-0050	100ml
2	TBD™ 细胞分离专用抗凝剂	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

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

3. 无菌硅化离心管

序号	产品名称	产品货号	规格
1	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

a. 分离液需常温（37℃-15℃）避光保存，严禁冷藏冷冻保存；

b. 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。

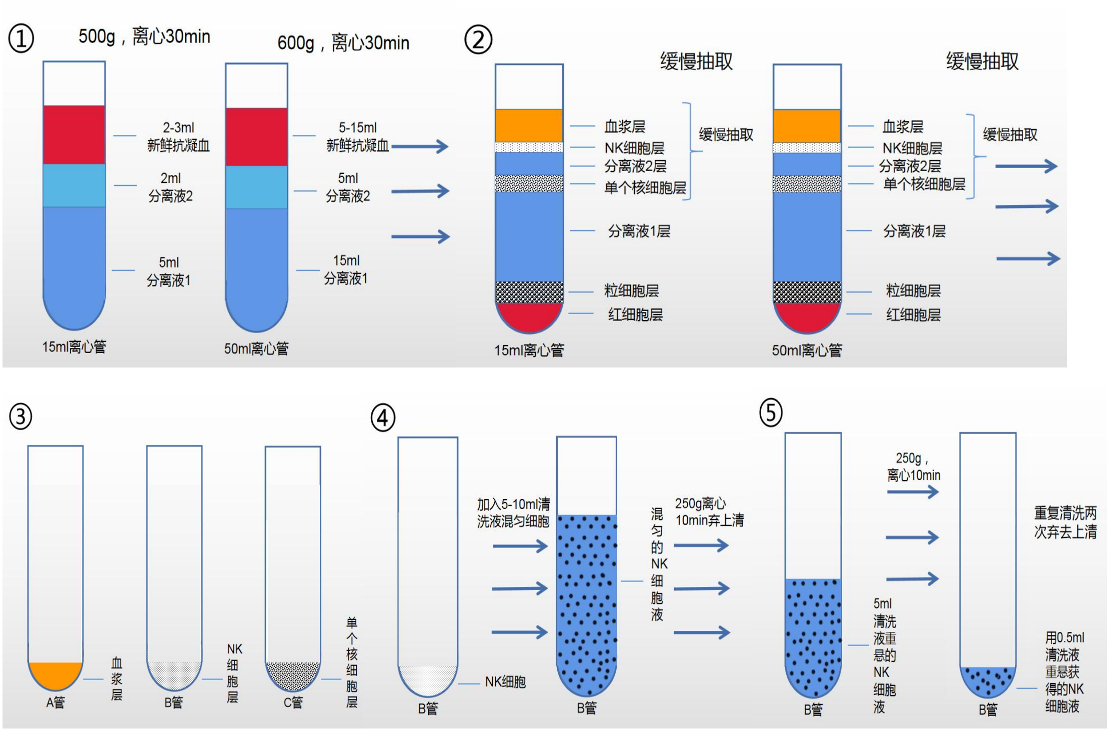
实验方法：方法一如下（不需血浆留存备用）：

1. 取一支 15ml 无菌离心管，先加入 5ml 分离液 1，后缓慢加入 2ml 分离液 2，形成梯度界面，再缓慢吸取 2-3ml 新鲜抗凝血加于分离液液面之上。各液面分层一定要清晰。或取一支 50ml 无菌离心管，先加入 15ml 分离液 1，后缓慢加入 5ml 分离液 2，再缓慢吸取 5-15ml 新鲜抗凝血加于分离液液面之上。各液面分层一定要清晰。(分离液试剂总量不得少于 4ml，新鲜抗凝血不得少于 2ml。总液体量不得超过 2/3)。

注：两层分离液添加完成后，需要在 1min 内添加血液样本。

2. 以 500g 或 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（“XX”动物）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 中备用（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（“XX”动物）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(“XX”动物)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



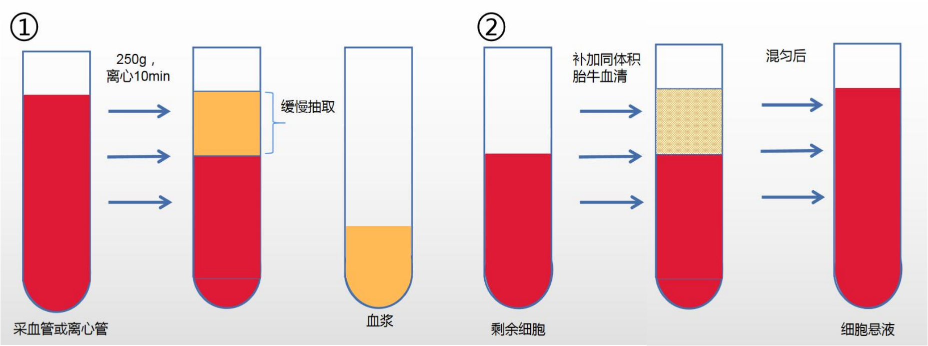
实验方法：方法二如下（需留取血浆备用）：

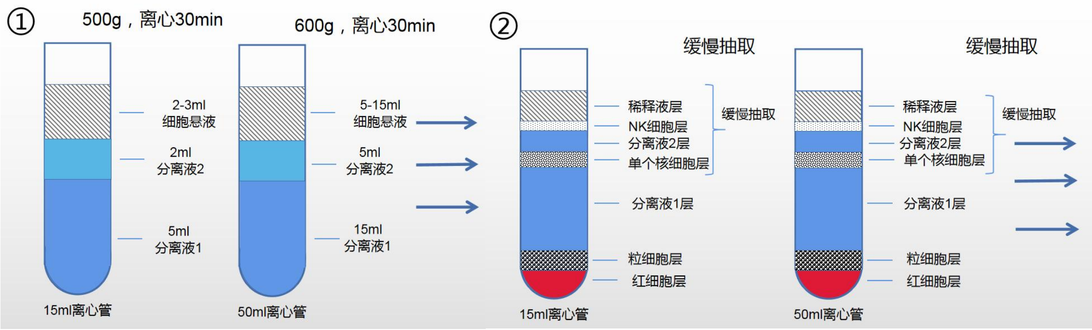
1. 首先取抗凝血，250g，离心 10min，抽取血浆留存备用。补加胎牛血清(添加量与留存血浆量等同) 制成细胞悬液，根据细胞悬液体积，选择适当离心管进行试验。
2. 取一支 15ml 无菌离心管，先加入 5ml 分离液 1，后缓慢加入 2ml 分离液 2，形成梯度界面，再缓慢吸取 2-3ml 细胞悬液血加于分离液液面之上。各液面分层一定要清晰。或取一支 50ml 无菌离心管，先加入 15ml 分离液 1，后缓慢加入 5ml 分离液 2，再缓慢吸取 5-15ml 细胞悬液血加于分离液液面之上。各液面分层一定要清晰。（分离液试剂总量不得少于 4ml，细胞悬液不得少于 2ml。总液体量不得超过 2/3）。

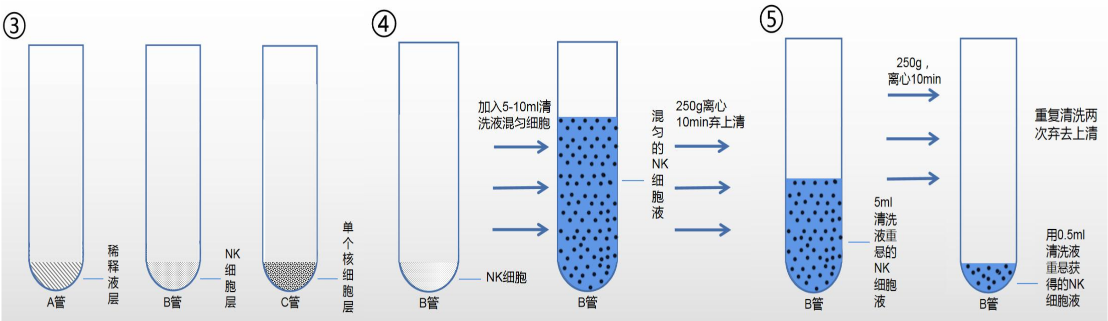
注：两层分离液添加完成后，需要在 1min 内添加血液样本。

3. 以 500g 或 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。）
4. 离心后，离心管中由上至下分为六层。第一层为稀释液层。第二层环状乳白色为（“XX”动物）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。
5. ①小心吸取稀释液层转移到新离心管 A 中备用（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（“XX”动物）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。
6. 向含有（“XX”动物）NK 细胞层离心管 B 中，加入 5-10ml 清洗液（产品编号：2010X1118），混匀细胞。
7. 250g，离心 10min。弃去上清。
8. 用吸管吸取 5ml 清洗液（产品编号：2010X1118）重悬所得细胞。
9. 250g，离心 10min，弃去上清。
10. 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



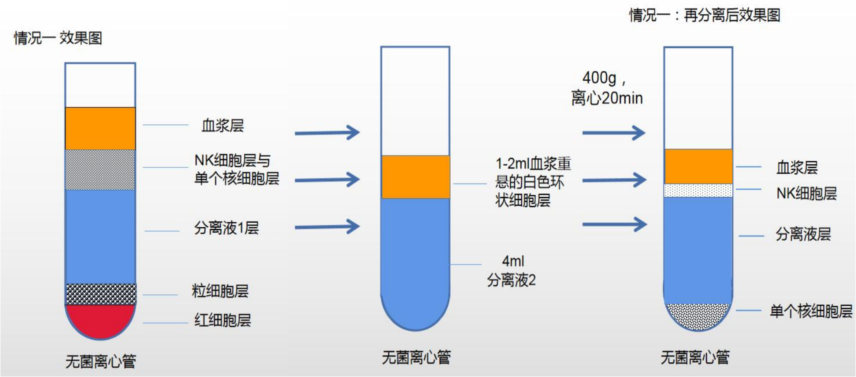




【分离过程中可能出现的情况及处理方案】

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。
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 NK 细胞提取率大于 80%。

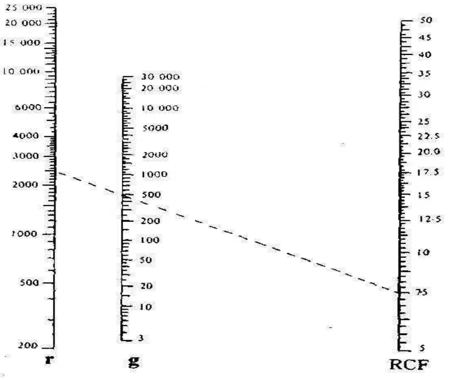
【可能存在的问题及解决方法】

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:



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。

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