



# 血液样本制备

实验技术与实验方案

# 目录

|                         |    |
|-------------------------|----|
| 介绍                      | 3  |
| 血液样本来源                  | 3  |
| 骨髓                      | 3  |
| 全血                      | 3  |
| 单采术产品                   | 4  |
| 单采血小板滤器                 | 4  |
| 脐带血                     | 4  |
| 白膜层                     | 4  |
| 血液样本制备方法概述              | 5  |
| 红细胞（RBC）去除              | 5  |
| 用氯化铵裂解红细胞               | 5  |
| 沉降                      | 5  |
| 免疫磁珠去除红细胞               | 6  |
| 白膜层制备                   | 7  |
| 从全血中制备外周血单个核细胞（PBMCs）   | 7  |
| 使用密度梯度离心分离PBMCs         | 7  |
| 使用免疫磁珠分离PBMCs           | 9  |
| 从全血中制备多形核细胞（PMNCs）      | 10 |
| 什么是免疫磁珠细胞分选？            | 11 |
| 自动化免疫磁珠细胞分选             | 12 |
| 从单个样本中依次分离多种细胞类型        | 12 |
| 从大体积样本中分离细胞             | 13 |
| 从全血中分离免疫细胞亚群            | 14 |
| 使用免疫密度梯度法直接从全血中分离细胞     | 14 |
| 直接从全血中进行免疫磁珠细胞分选        | 15 |
| 从PBMCs或PMNCs中进行免疫磁珠细胞分选 | 15 |
| 其他免疫细胞分选的方法             | 16 |
| 冻存分选后细胞                 | 16 |
| 保存实验方案和技巧               | 17 |
| 血液处理方案                  | 18 |
| 细胞分选和冻存方案               | 24 |
| 精选产品                    | 33 |

# 介绍

血液是免疫和非免疫细胞的重要来源,可以直接用于生物检测分析,也可以进一步处理以分离特定的细胞亚群。处理血液样本时,选择合适的实验方案和技术可以简化血液处理、提高实验室效率并减少操作失误的风险,有助于确保下游检测获得准确的结果。

通过这本电子书了解处理血液样本的不同技术和方案,以便您可以为特定应用选择正确的方法。您还可以将其用作实验技术的快速指南或用于培训新的实验室成员。

## 血液样本来源

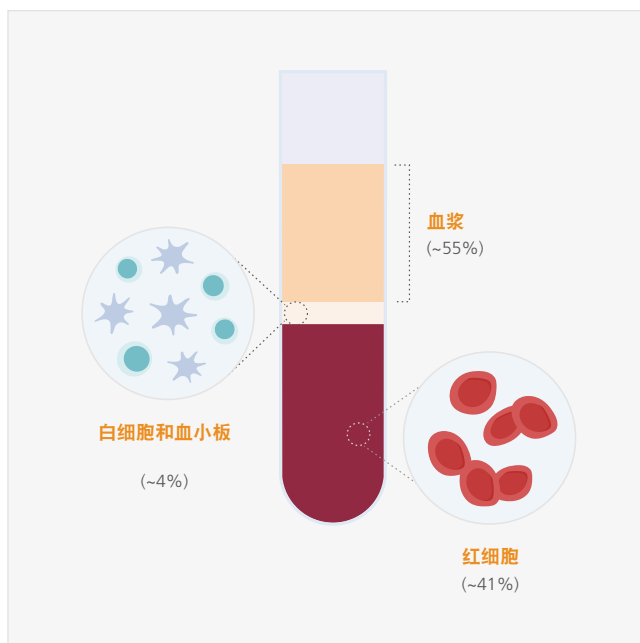
血液和血液衍生产品的起始样本可以有多种来源,包括骨髓、循环血液、单采术产品、脐带血和白膜层。您使用的血液或血液样本来源取决于您处理样本的工具以及预期的下游应用。在本节中,您将了解不同类型的血液样本来源及其用途。

### 骨髓

人骨髓是造血干细胞和祖细胞(HSPCs)的丰富来源,HSPCs负责产生白细胞、红细胞和血小板等血细胞。

### 全血

全外周血(即循环血)由血浆、红细胞、白细胞和血小板组成。白细胞可进一步分为含有颗粒(即中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞)的多形核细胞(PMNCs或粒细胞)或具有单个核的单个核细胞(即淋巴细胞和单核细胞)。



#### 挂图

血液相关来源中人细胞类型的比例

[www.stemcell.com/cells-wallchart](http://www.stemcell.com/cells-wallchart)

## 单采术产品

单采术是从个体中抽取全血，分离不同血液成分，并在去除特定成分（例如血浆、血小板或白细胞）后重新回输个体的过程。白细胞单采术是单采术的一种形式，其从捐献者的循环血液中收集白细胞。白细胞单采术样本是富集的血小板单采术产品，与全血或白膜层相比，其含有更高浓度的白细胞。它们是单个核细胞的理想来源，可用于免疫细胞分选。

请参阅第18页，了解用于[下游细胞分选的血小板单采术样本处理方案](#)。

血小板单采术是用于收集血小板的另一种形式的单采术。该过程包括白细胞去除步骤即从血小板中去除白细胞。白细胞去除会产生[单采血小板滤器 \(LRSC\)](#) 作为副产品，可用作下游应用的细胞来源（请参阅下一节）。

### 单采血小板滤器

[单采血小板去白细胞滤器 \(LRSC, The Leukocyte Reduction System cone\)](#)，也称为单采血小板滤器，在白细胞单采术产品的收集过程中使用（图1）。LRSC含有高浓度的白细胞，可以使用细胞分选产品进一步处理以纯化细胞。对于所有的这些血液样本来源，均可使用[EasySep™细胞分选试剂盒](#)分离特定的细胞亚群，用于之后的下游分析。

请参阅第20页，了解[处理LRSC以进行下游细胞分选的方案](#)。

## 脐带血

脐带血是在出生后立即从胎盘和脐带中采集的。由于其具有强大的祖细胞增殖、多谱系分化和体外自我更新的功能，脐带血来源的细胞是用于药物开发、再生细胞治疗和免疫调节研究的理想选择。与源自其他组织的CD34<sup>+</sup>造血干细胞和祖细胞（HSPCs）相比，源自脐带血的HSPCs也更加原始，使其成为移植研究的理想选择。



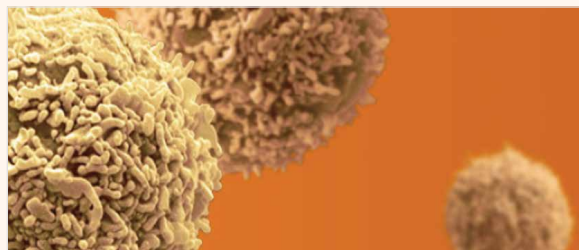
图1. LRSC

LRSC（产品号#200-0093）含有原代人白细胞。

## 白膜层

白膜层是白细胞的浓缩悬液，由全血或骨髓离心后获得。从全血样本生成白膜层可浓缩大量样本并减少下游细胞分选处理。

有关[从全血制备白膜层](#)的方案，请参见第21页。



### 使用正确的细胞开始研究

从外周血、动员外周血、脐带血或骨髓中分离出可靠的、合规的人原代细胞。

[www.stemcell.com/PrimaryCells](http://www.stemcell.com/PrimaryCells)

# 血液样本制备方法概述

## 红细胞 (RBC) 去除

红细胞 (RBCs) 污染样本可能会干扰下游分析。因此, 在处理血液样本以分离特定细胞类型时, 可能需要在细胞制备步骤中去除红细胞。以下是去除红细胞的方法示例:

- 用氯化铵裂解红细胞
- 葡聚糖沉降
- 使用[EasySep™ RBC去除试剂](#)进行免疫磁珠细胞分选

进行红细胞去除后, 所得样本将仅包含有核白细胞, 可用于下游检测或进一步处理以分离特定的细胞亚群。

### 用氯化铵裂解红细胞

从血液样本中去除红细胞广泛使用的一种方法是用氯化铵裂解。自制或市售的[氯化铵溶液](#) (也称为裂解缓冲液) 可裂解血液样本中的红细胞, 同时保持白细胞完整。剩余的白细胞可准备用于下游检测或进一步的细胞亚群分选。虽然裂解缓冲液价格便宜, 但该过程难以自动化。

有关使用氯化铵裂解以[制备多形核细胞的方案](#), 请参见第22页。

STEMCELL Technologies的[氯化铵溶液](#)经过优化, 可温和裂解红细胞, 同时将对白细胞的影响降至最低。可用于人或小鼠外周血、脾脏或骨髓样本的红细胞裂解。

标准氯化铵裂解法可能会对脐带血中的造血或免疫祖细胞造成影响, 因此需要使用另外的红细胞去除方法 (例如红细胞沉降或免疫磁珠分选)。另一个需要考虑的因素是脐带血中的血小板数量非常高, 这可能会促进血栓形成。因此在处理样本时, 使用合适的抗凝剂 (例如酸性柠檬酸葡萄糖[ACD] 或EDTA) 并遵循厂商关于脐带血的特定说明非常重要。

## 沉降

沉降的原理是通过重力使体积及密度较大的成分沉积得更快。由于其沉降速率高, 样本中最大和最致密的成分可以通过初始低离心力沉淀。然后收集上清液, 并通过连续的离心, 可以分离出沉降速率逐渐降低的组分。沉降的成本低廉, 但通常纯度低于其他方法。

右旋糖酐可用于通过聚集红细胞进行沉降, [HetaSep™](#)是另一种替代方法。这些试剂使聚集的红细胞比分散的细胞沉降得更快, 从而可以有效地与上清液中的有核细胞分离。

## 免疫磁珠RBC去除

虽然沉降和使用氯化铵进行红细胞裂解是广泛使用且经济高效的从血液样本中去除红细胞的方法, 但其不适用于某些血液样本来源, 难以自动化且获得的细胞纯度较低。免疫磁珠细胞分选可特异性去除血液样本中的红细胞, 留下其他细胞。免疫磁珠细胞分选使用针对特定细胞表面抗原的抗体或配体来选择或去除目的细胞。被标记的细胞与磁珠交联, 当置于磁场时, 磁珠可以被磁场吸附从而将它们与未标记的细胞分离。有关免疫磁珠细胞分选的更多信息, 请参见第11页。

EasySep™ RBC去除试剂通过免疫磁珠靶向去除红细胞, 从而快速分离未标记、高纯度的人白细胞。这种基于细胞表面标志物来定向去除RBCs比裂解更有效, 并且纯化的样本中残留的RBCs更少(图2)。此外, 该方法避免了将白细胞暴露于裂解缓冲液中, 有利于下游的应用和分析。该方法简单快速, 手动使用EasySep™ RBC去除试剂去除红细胞只需9分钟。此外, 也可以使用RoboSep™细胞分选仪进行自动化操作, 以实现标准化和提高效率。

EasySep™ RBC去除试剂与不同的血液来源和血液相关产品兼容, 包括:

- 白膜层
- 骨髓
- 脐带血
- 白细胞单采术样本
- 全血
- LRSC

有关使用EasySep™ Direct去除红细胞的更多信息, 请参见第9页。



## 无需裂解、洗涤或离心即可去除红细胞

使用EasySep™ RBC去除试剂通过免疫磁珠去除红细胞并获得高纯度且未标记的白细胞。剩余的白细胞可用于各种下游应用, 包括细胞培养、RNA分离或酶活性检测。

[www.stemcell.com/easysep-rbc-depletion](http://www.stemcell.com/easysep-rbc-depletion)

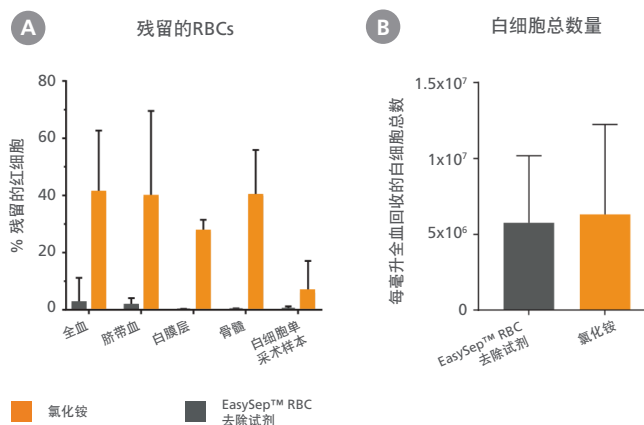


图2. 与氯化铵裂解相比, EasySep™ RBC去除试剂可提供更好的红细胞去除效果

对来自正常健康供体的不同类型的样本使用氯化铵 (NH<sub>4</sub>Cl) 或使用EasySep™ RBC试剂去除红细胞。(A) 使用EasySep™ RBC去除试剂后, 各种样本中残留红细胞 (血型糖蛋白A<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>) 的百分比显著低于用氯化铵处理样本中的百分比 (平均值 ± 标准偏差; n = 31)。(B) 使用氯化铵裂解红细胞或使用EasySep™ RBC去除试剂去除红细胞, 结果表明从全血样本中回收的白细胞总数相当 (平均值 ± 标准偏差; n = 37)。



### 试用申请

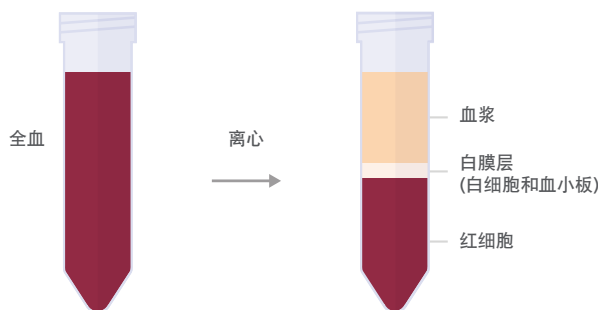
申请试用EasySep™ RBC去除试剂

[www.stemcell.com/sample-easysep](http://www.stemcell.com/sample-easysep)



# 白膜层制备

使用低速密度梯度离心可将全血或骨髓样本分离为血浆、红细胞（RBCs）和白细胞。这种白细胞也称为白膜层，可使用免疫磁珠细胞分选技术分离特定细胞亚群以进行下游应用。



从全血中制备白膜层的实验方案请参见第21页。

点击查看STEMCELL用于血液样本处理的[细胞分选与离心试管](#)。

## 从全血中制备外周血单个核细胞 (PBMCs)

从血液样本中收集的人外周血单个核细胞 (PBMCs) 可用于各种研究应用, 包括流式细胞术、细胞分选、细胞培养和基于细胞的检测。PBMCs被定义为具有圆形细胞核的白细胞, 包括淋巴细胞 (即T细胞、B细胞和NK细胞)、单核细胞和树突状细胞。

从全血中制备PBMCs是分离特定免疫细胞亚群之前的常见步骤。从人全血中收集和制备PBMCs的方法有多种, 包括:

- 密度梯度离心
- 免疫磁珠细胞分选, 如[EasySep™ Direct人PBMC分选试剂盒](#)



## 使用密度梯度离心分离PBMCs

最常见的PBMC分选方法是密度梯度离心, 其依赖于样本中不同组分细胞密度的差异 (图3)。首先, 在离心前将样本置于密度梯度离心液 (例如Ficoll-Paque®或Lymphoprep™) 上。在离心过程中, 每种细胞类型都会沉降到其等密度点, 即离心液梯度中细胞和离心液密度相同的位置。

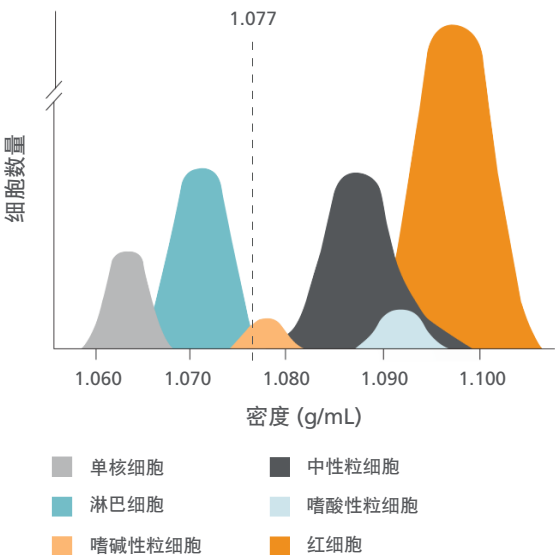
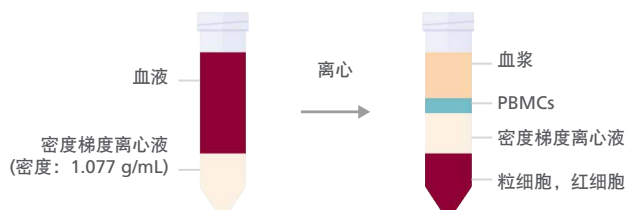


图3. 人血细胞的密度和相对数量

为了从全血中分离单个核细胞, 密度梯度离心液的密度应为1.077 g/mL。Lymphoprep™和Ficoll-Paque®是类似的离心液, 由糖类和泛影酸钠组成。两者的密度均为1.077 g/mL, 建议使用密度梯度离心从外周血、脐带血或骨髓中分离单个核细胞。

通过密度梯度离心富集PBMCs时, 首先用PBS稀释全血, 然后小心地将其加至密度梯度离心液 (例如Lymphoprep™) 上。离心过程中, 密度较高的细胞 (即粒细胞和红细胞) 通过密度梯度离心液沉降。PBMCs沉降在密度梯度离心液和血浆层之间, 可以从中小心地收集。



参见第24页, 了解[通过密度梯度离心从全血中分离单个核细胞的详细方案](#)。

虽然密度梯度离心是一种经济的细胞分选技术, 但其特异性有限、纯度低、通量低且不能自动化。此外, 虽然密度梯度离心是一种常见的实验室技术, 但其是一个缓慢且费力的过程, 难以掌握。用户需要小心地将样本加到密度梯度离心液上, 在关闭刹车的情况下离心30分钟, 然后小心地收集并清洗目的细胞。因此, 从一份样本中分离PBMCs通常至少需要45分钟。

**小技巧:** 使用[SepMate™ PBMC分选离心管](#)时, 密度梯度离心步骤更快、更高效。SepMate™管中的特殊插件可防止各层混合, 从而使您可以在密度梯度离心液上快速地加入血液样本。这简化了密度梯度离心方案, 从而减少错误并提高一致性。



## 经济高效的密度梯度离心液

使用Lymphoprep™密度梯度离心液, 从外周血、脐带血或骨髓中分离单个核细胞。

[www.stemcell.com/lymphoprep](http://www.stemcell.com/lymphoprep)



## 轻松分离PBMCs

使用SepMate™, 通过密度梯度离心法在短短15分钟内分离PBMCs, SepMate™是一种专用离心管, 允许用户在密度梯度离心液上快速地加入血液样本, 可防止各层混合, 有利于轻松收集目的细胞。

[www.SepMate.com](http://www.SepMate.com)



### 视频

如何使用SepMate™ PBMC离心管从全血中分离PBMCs

[www.stemcell.com/sepmate-video](http://www.stemcell.com/sepmate-video)



### 试用申请

申请试用SepMate™离心管

[www.stemcell.com/sample-sepmate](http://www.stemcell.com/sample-sepmate)



## 使用免疫磁珠细胞分选法分离PBMCs

与耗时的密度梯度离心相比, 免疫磁珠细胞分选可直接从血液分离PBMCs, 而且还可以实现自动化。例如, [EasySep™ Direct 人PBMC分选试剂盒](#)可通过免疫磁珠去除RBCs、血小板和不需要的细胞, 在短短20分钟内获得PBMCs (图4)。未标记的PBMCs只需倒入新试管中即可立即用于下游应用, 例如流式细胞术或细胞培养。有关免疫磁珠细胞分选的更多信息, 请参见第11页。

## EasySep™ Direct PBMC分选与密度梯度离心的对比

### 1. 减少血小板污染

密度梯度离心不会去除血小板, 血小板很容易被激活并影响下游应用。初始密度梯度离心后去除血小板需要额外且耗时的洗涤步骤。EasySep™ Direct人PBMC分选试剂盒可在细胞分选步骤中便捷地去除血小板, 无需额外洗涤。

### 2. 减少粒细胞污染

血液样本中的粒细胞会随着时间的推移发生脱粒现象并改变密度。当使用密度梯度离心处理储存时间较长的血液样本 (采集后 > 48小时) 时, 可能会发生PBMC的粒细胞污染。通过使用抗体复合物和磁珠去除不需要的细胞, EasySep™ Direct人PBMC分选试剂盒比密度梯度离心减少了粒细胞污染 (见图5)。

### 3. 实现自动化PBMC分选

使用EasySep™ Direct进行PBMC分选可以通过[RoboSep™-S仪器](#)实现自动化, 以最大限度地减少样本处理步骤和时间。通过自动化所有样本标记和磁珠分选步骤, 您可以同时对四个样本进行细胞分选, 提高通量。

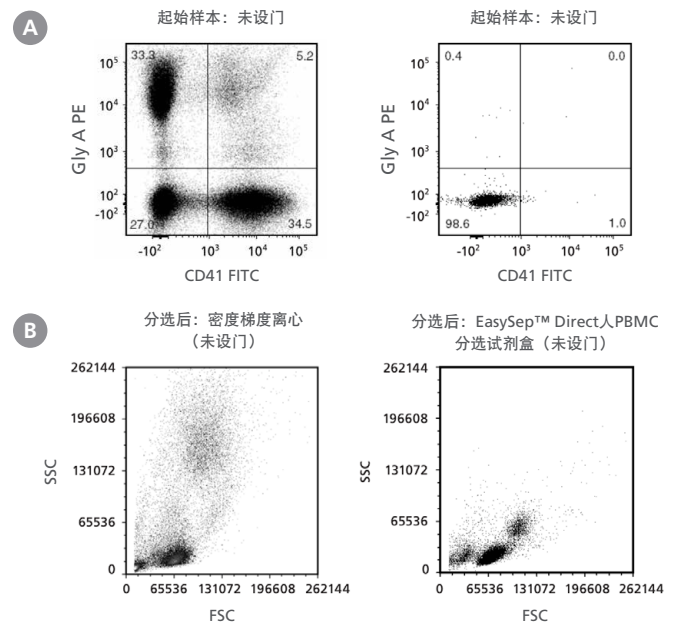


图4. 典型的EasySep™ Direct人PBMC分选图示

(A) 起始样本为正常健康供体的人全血, 未经过裂红的单个核细胞含量通常为  $98.3 \pm 2.8\%$  (以CD45设门)。在上述示例中, 全血起始样本 (用氯化铵裂红) 和未经过裂红的单个核细胞含量分别为  $27.0\%$  和  $98.6\%$  (未以CD45设门)。(B) 使用密度梯度离心或EasySep™ Direct人PBMC分选试剂盒从全血样本中分离单个核细胞。如图为代表性FSC与SSC流式细胞术图 (未以CD45设门)。

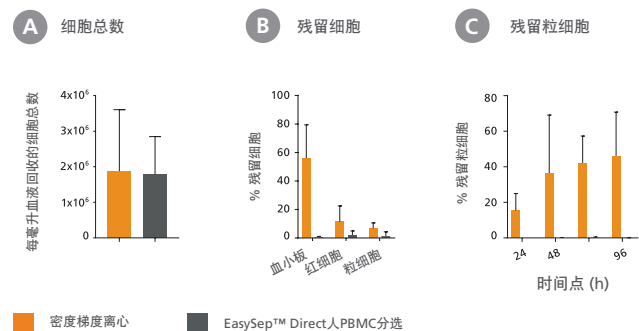


图5. EasySep™ Direct人PBMC分选试剂盒比密度梯度离心产生的细胞污染更少

使用密度梯度离心或EasySep™ Direct人PBMC分选试剂盒从全血样本中分离PBMCs。通过流式细胞术对细胞进行计数和分析。(A) 使用密度梯度离心和EasySep™ Direct人PBMC分选试剂盒从24小时的血液样本中回收的有核细胞总数相当 (平均值±标准偏差;  $n = 14$ )。 (B) 使用EasySep™ Direct人PBMC分选试剂盒从24小时的血液样本中获取PBMCs, 与密度梯度离心相比, 残留的血小板 (CD41<sup>+</sup>)、红细胞 (血型糖蛋白A<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>) 和粒细胞 (CD66b<sup>+</sup>) 更少 (平均值±标准偏差;  $n = 15$ )。 (C) 使用EasySep™ Direct人PBMC分选试剂盒从24、48、72和96小时的血液样本中分离PBMCs, 与使用密度梯度离心相比, 残留的粒细胞更少 (平均值±标准偏差;  $n = 3$ )。

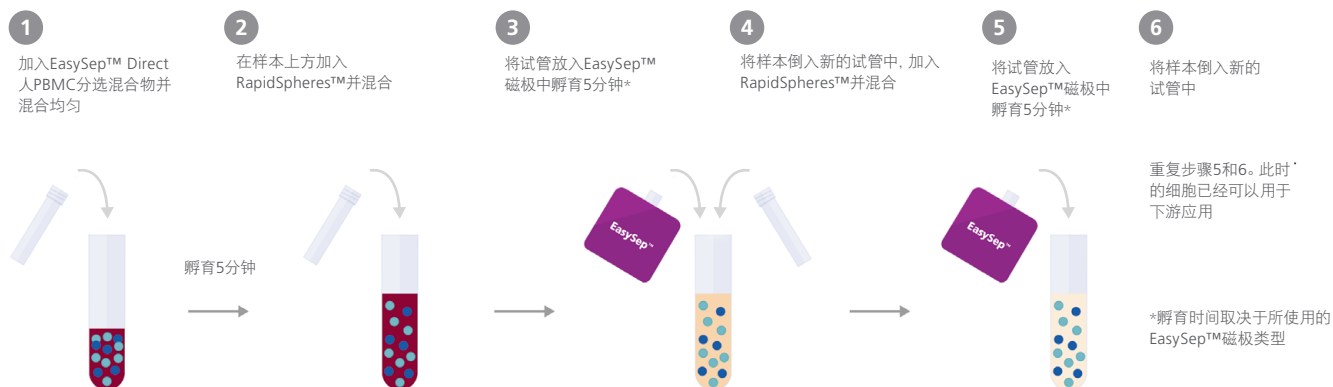


图6. EasySep™ Direct人PBMC分选试剂盒的实验方案

## 从全血中制备多形核细胞 (PMNCs)

多形核细胞 (PMNCs), 也称为粒细胞, 是免疫细胞亚群的集合, 其含有可在细胞激活时释放的含酶颗粒。PMNCs包括中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞和肥大细胞。要从全血中获取特定的PMNCs细胞群, 您可以进行以下任一操作:

- 进行密度梯度离心, 用氯化铵裂解粒细胞中的红细胞 (RBCs)。请参阅第22页的实验方案。然后可以使用免疫磁珠细胞分选技术分离特定的粒细胞亚群 (即中性粒细胞、嗜碱性粒细胞或嗜酸性粒细胞)。
- 使用免疫磁珠细胞分选技术, 直接从全血中分离粒细胞, 无需裂红或密度梯度离心。例如, 使用EasySep™ Direct试剂盒使您能够快速、轻松地获得粒细胞或特定粒细胞亚群 (即中性粒细胞、嗜碱性粒细胞或嗜酸性粒细胞)。EasySep™ Direct使用免疫磁珠细胞分选技术从全血中分离PMNCs (有关密度梯度离心和EasySep™ Direct之间的比较, 请参见第9页)。



### 视频

观看EasySep™ Direct如何工作

[www.stemcell.com/easysep-direct-video](http://www.stemcell.com/easysep-direct-video)



### 试用申请

申请试用EasySep™ Direct人PBMC分选试剂盒

[www.stemcell.com/sample-easysep](http://www.stemcell.com/sample-easysep)

# 什么是免疫磁珠细胞分选?

免疫磁珠细胞分选是通过磁珠从异质细胞悬浮液中分离靶细胞。为了实现这一目标, 磁性颗粒 (也称为磁珠) 通过抗体与靶细胞上的特定细胞表面蛋白结合。然后将样本置于磁场中, 磁场会吸附被磁珠和抗体标记的细胞, 而未标记的细胞则保留在上清液中, 从而分离样本中的目的细胞和非目的细胞。

免疫磁珠细胞分选可以选择使用或不使用分选柱。EasySep™是一种无柱的免疫磁珠细胞分选技术, 无需样本洗涤等额外的操作即可进行下游应用。EasySep™可用于多种组织类型, 包括但不限于全血、白细胞单采术样本、LRSC、骨髓、白膜层和脐带血。使用EasySep™可以进行正选、负选或细胞去除, 最快只需8分钟即可获得纯化的免疫细胞亚群。

由于其速度快且简单, 免疫磁珠细胞分选通常用于分离高纯度的特定细胞亚群。免疫磁珠细胞分选具有多种优势, 包括:

- 高纯度
- 快速
- 方便
- 低成本
- 高通量
- 可自动化
- 高细胞活性

正选和负选都可以使用免疫磁珠细胞分选方法 (图7)。当进行正选时, 可以弃去上清液, 被磁珠和抗体标记的目的细胞保留在试管中。当进行负选时, 所需的细胞位于上清液中。

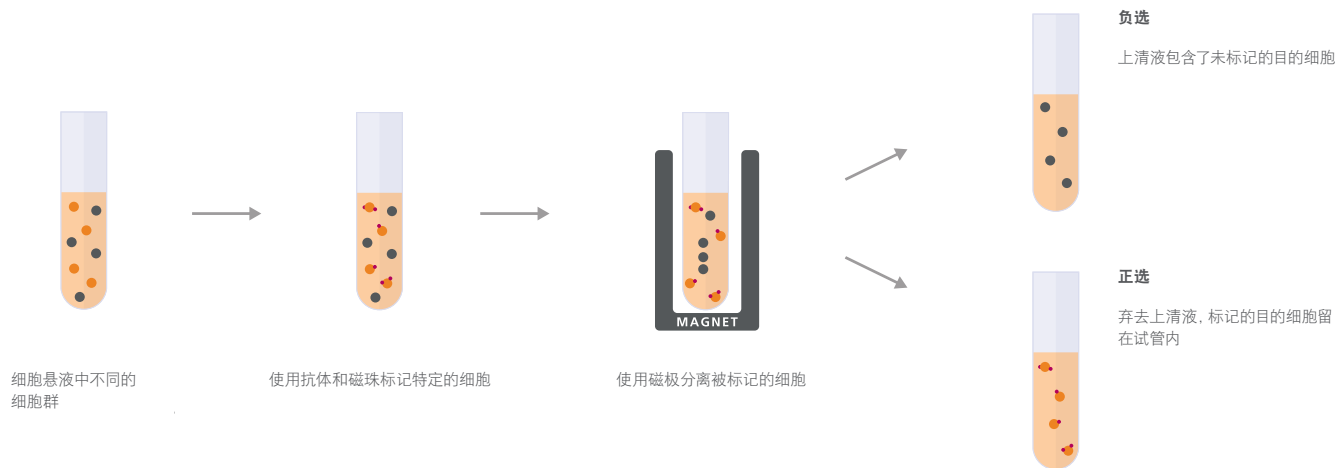


图7. 正选和负选的比较



## 视频

EasySep™磁珠细胞分选技术的工作原理

[www.stemcell.com/easysep-video](http://www.stemcell.com/easysep-video)



## 电子书

细胞分选技术: 您需要了解的一切

[www.stemcell.com/cell-separation-ebook](http://www.stemcell.com/cell-separation-ebook)

## 自动化免疫磁珠细胞分选

通过自动化免疫磁珠细胞分选流程, 大幅减少样本处理时间。[RoboSep™-S](#)和[RoboSep™-16](#)仪器是真正的自动化细胞分选系统, 保留了[EasySep™](#)细胞分选技术的速度和简单性, 使您能够同时从多达4或16个样本中分离细胞。无柱系统最大限度地减少了样本处理, 避免了样本之间交叉污染的风险, 并降低了暴露于危险病原体的风险。

## 从单个样本中依次分离多种细胞类型

许多分析(例如嵌合体检测)通常是在小体积血液样本(例如儿科样本)中进行的。在这些情况下, 分析纯化的细胞亚群需要从完整的起始样本中有效地分离出一种以上的细胞类型。[RoboSep™-16](#)可用于从单个样本中依次分离多达四种不同的细胞类型, 并能够同时处理多达四种不同的样本(图8)。

## 全自动细胞分选

RoboSep™-S和RoboSep™-16仪器完全自动化EasySep™流程的细胞标记和分选步骤, 最大限度地减少样本处理时间。

[www.RoboSep.com](http://www.RoboSep.com)

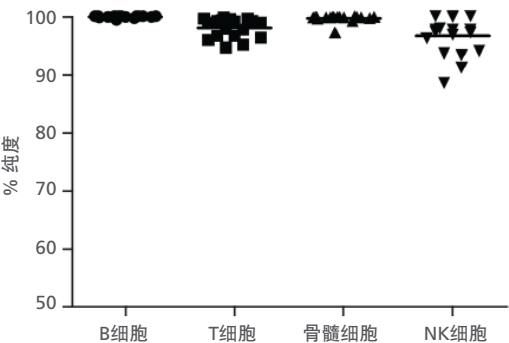


图8. 使用RoboSep™-S从18个不同的样本中依次分离出四种不同细胞类型的纯度

数据由佛罗里达医院实验室主管Max Marschner友情提供。



### 视频

使用RoboSep™-S细胞分选仪器自动进行细胞分选

[www.stemcell.com/robossep-s-video](http://www.stemcell.com/robossep-s-video)



### 技术帖

从单个样本中依次分离多种细胞类型

[www.stemcell.com/sequential-isolation](http://www.stemcell.com/sequential-isolation)

## 对大体积样本进行细胞分选

处理大量血液样本（例如全血或白细胞单采术样本）可能非常耗时，并且需要拆分样本进行多轮的细胞分选。您可以使用[Easy 250 EasySep™磁极](#)轻松扩大血液样本处理规模，并且无需拆分样本。该磁极采用无柱的免疫磁珠EasySep™细胞分选技术，一次即可处理高达225 mL（或120亿个细胞）样本（图9）。

使用这项技术，当样本放入磁极时，标记的细胞在磁场的作用下被吸附到[标准T-75 cm²细胞培养瓶](#)的侧面。然后可将未标记的细胞移入新的试管中以用于下游应用。

有关[如何通过依次分选从单个样本中分离多种细胞类型](#)的更多信息，请参阅第26页。

请访问[STEMCELL.com/cultureware](http://STEMCELL.com/cultureware)，探索我们精选的[培养瓶](#)、[试管](#)、[移液管](#)等。



\*这是下一代负选试剂盒常规的孵育时间。每个试剂盒的孵育时间将根据所使用的具体分选方案而有所不同。

图9. Easy 250 EasySep™ 磁珠细胞分选方案（负选）

有关[使用Easy 250 EasySep™磁极进行细胞分选](#)的方案，请参见第26页。



### DEMO申请

申请Easy 250 EasySep™磁极演示

[www.stemcell.com/demo-easy250](http://www.stemcell.com/demo-easy250)



### 视频

如何使用Easy 250 EasySep™磁极从大体积样本中分离免疫细胞

[www.stemcell.com/easy-250-easysep-video](http://www.stemcell.com/easy-250-easysep-video)

# 从全血中分离免疫细胞亚群

通常需要从血液中分离特定的免疫细胞亚群以用于各种应用（研究、检测开发和诊断等）。根据需求和可用设备，您可以直接从全血中分离特定的免疫细胞亚群，也可以首先获得外周血单个核细胞（PBMCs）、多形核细胞（PMNCs），然后进行免疫细胞亚群分选。您可以使用多种方法来获取特定的细胞亚群。本节将介绍以下方法：

- 使用免疫密度梯度细胞分选直接从全血中获取细胞亚群
- 使用免疫磁珠细胞分选直接从全血中获取细胞亚群
- 首先分离PBMCs或PMNCs（更多信息请参见第7和10页），然后进行免疫磁珠细胞分选以获得特定的细胞亚群
- 从PBMCs和PMNCs中分离特定免疫细胞的其他方法

## 使用免疫密度梯度法直接从全血中分离免疫细胞

免疫密度梯度细胞分选，也称为红细胞玫瑰花结，是一种结合抗体标记和密度梯度离心的负选方法。在此方案中，将抗体混合物添加到全血样本中，其中不需要的细胞被标记并与红细胞交联，形成被称为免疫玫瑰花结的复合物，其密度远大于分离的单个核细胞。在离心过程中，不需要的细胞与红细胞一起沉降在底部，所需的细胞将留在密度梯度离心液上方的细胞层中。

免疫密度梯度细胞分选不需要离心机以外的任何专用设备，与已建立的密度梯度离心方案相兼容，并且可用于直接从全血中分离特定的细胞亚群。然而，该技术仅限于负选，对操作人员的血液样本分层技术有一定的要求，并且需要起始样本中有高浓度的红细胞。

[RosetteSep™](#)是一种快速简便的免疫密度梯度工具，用于直接从全血中分离未标记的细胞。这种方法通过将细胞亚群分选步骤纳入到离心过程中，显著减少了样本处理时间并最大限度地提高了便利性（图10）。RosetteSep™可与[SepMate™](#) PBMC离心管结合使用，实现更快、更轻松的免疫密度梯度细胞分选。

有关通过[免疫密度梯度分离特定细胞亚群](#)的方案，请参见第25页。

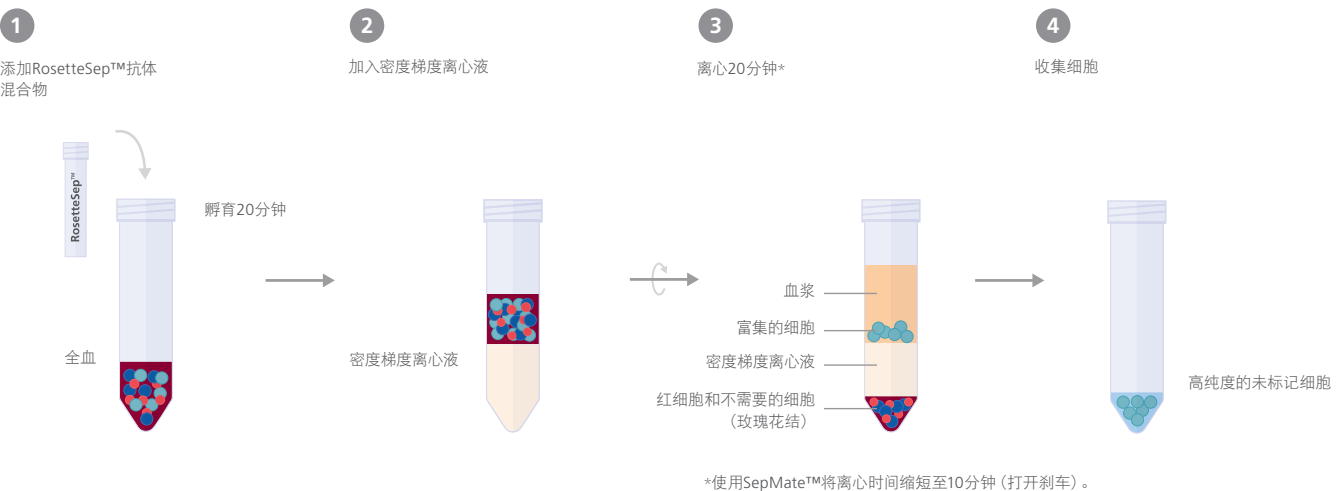


图10. RosetteSep™细胞分选方案



## 直接从全血中进行免疫磁珠细胞分选

免疫磁珠细胞分选是一种使用抗体连接的磁珠从异质细胞悬液中分离目的细胞的技术。由于其速度快且简单，免疫磁珠细胞分选是分离高纯度特定细胞亚群的最常用方法之一。有关免疫磁珠细胞分选的更多信息，请参见第11页。

[EasySep™ Direct](#)是一种免疫磁珠细胞分选方法，可用于直接从全血中分离特定的细胞亚群。如前所述，EasySep™ Direct可直接从全血中分离PBMCs和PMNCs（参见第7页和第10页），通过免疫磁珠一步去除红细胞和其他不需要的细胞，无需密度梯度离心、红细胞裂解或其他可能改变细胞功能或增加细胞分选时间的步骤。EasySep™ Direct试剂盒可用于分离各种特定细胞类型。分离得到的细胞未经标记且纯度高，是基因表达分析、功能检测或流式细胞术等下游应用的理想选择。

使用EasySep™ Direct时，可在20分钟内处理0.5 - 30 mL的单个样本。若要同时从多达16个样本中分离细胞，请将EasySep™ Direct与[EasyEights™ EasySep™磁极](#)结合使用。有关EasySep™ Direct工作原理的更多信息，请参见第9页。



### 直接从全血中分离细胞

通过免疫磁珠一步去除红细胞和不需要的细胞，直接从全血中快速获得高纯度的细胞，无需密度梯度离心、沉降或红细胞裂解。使用EasySep™ Direct分离的未经标记的细胞非常适合基因表达分析、功能检测和流式细胞术等下游应用。

[www.EasySepDirect.com](http://www.EasySepDirect.com)

## 使用免疫磁珠法从PBMCs或PMNCs中分离细胞

从血液制品中获得PBMCs或PMNCs后（请参见第7页查看有关如何分离PBMCs的信息，请参见第10页查看有关如何分离PMNCs的信息），可以对其进行免疫磁珠细胞分选，从而获得所需的细胞亚群。例如，EasySep™是一种多功能免疫磁珠细胞分选技术，可通过正选、负选或细胞去除在短短8分钟内获得免疫细胞亚群。使用EasySep™分离的细胞亚群纯度高，且兼具活性和功能性，可用于各种下游分析。有关免疫磁珠细胞分选的更多信息，请参见第11页。



### 试用申请

申请试用EasySep™进行免疫细胞亚群分选

[www.stemcell.com/sample-easysep](http://www.stemcell.com/sample-easysep)



### 视频

如何使用EasySep Direct™一次从多达16个血液样本中获得纯化的细胞

[www.stemcell.com/easysep-direct-easyeights](http://www.stemcell.com/easysep-direct-easyeights)

## 免疫细胞分选的其他方法

另外还有几种方法可从来源于全血的PBMCs或PMNCs中分离免疫细胞亚群。最常见的方法之一是流式细胞荧光分选 (FACS)，其结合流式细胞术和荧光探针针对细胞悬液进行分选。荧光团标记的抗体与单细胞悬液中靶细胞上特定抗原的表位结合。标记后，流式细胞仪将细胞悬液聚焦成均匀的单细胞流，然后通过一组激光器，激发细胞结合的荧光团并发射荧光。根据发射波长，产生的光信号被转换成一定数量的电子脉冲，将电荷分配给细胞周围形成的液滴。这种电荷使液滴能够偏转到收集管或进入废弃室中。与免疫磁珠细胞分选相比，FACS具有多种优势，包括：

- 可将细胞悬液以单个细胞进行排列
- 根据细胞内标志物（例如GFP）分离细胞
- 根据表面标志物表达分离细胞
- 可使用多个标志物以更高的纯度对复杂的细胞类型进行分离

与FACS相比，免疫磁珠细胞分选过程更快、更简单，因此通常是分离常见细胞类型的首选方法。

还有几种不太常用的细胞分选方法，例如浮力激活细胞分选、基于适配体的细胞分选和补体耗竭。有关这些其他方法的更多信息，请下载我们的[细胞分选电子书](#)。



### 冻存和储存活细胞

使用CryoStor®冻存液减轻冻存和复苏过程中温度引起的分子应激反应。这有助于在长期冻存后保持细胞高活力并最大限度地提高细胞回收率。

[www.stemcell.com/cell-storage-media-overview.html](http://www.stemcell.com/cell-storage-media-overview.html)

## 冻存分选后的细胞

在血液样本处理后，可将分选后的细胞（例如PBMCs）储存起来以用于将来的检测（例如流式细胞术）。为此，将细胞重新悬浮在冻存液中，使用标准的慢速控制冻存方案（约-1°C/分钟）冷却至极低温度，然后储存在液氮（低于 -135°C）中。待到需要时，可以将细胞复苏以用于下游应用，可使用便携式ThawSTAR® CFT2自动化解冻系统对该过程进行标准化和自动化。

请参见第29页查看[冻存PBMCs](#)的方案。

请参见第31页查看[复苏原代细胞](#)的方案。

使用可靠的冻存液（例如[CryoStor®冻存液](#)）确保冻存和复苏后细胞的高活力和功能稳定性。

使用高质量的冻存管和冻存容器，例如Corning® CoolCell® LX（[产品号 #200-0642](#)）实现可靠的样本冻存。

# 实验方案和技术

本节提供了处理血液样本、进行下游细胞分选和冻存细胞的优化方案和技术技巧。使用这些专业、全面的指南来制备您的起始样本并获得目的细胞。

有关细胞分选方案的完整列表, 请访问[www.stemcell.com/cell-separation-methods](http://www.stemcell.com/cell-separation-methods)

## 血液处理方案

|                                                |    |
|------------------------------------------------|----|
| 如何处理白细胞单采术样本以用于下游细胞分选                          | 18 |
| 如何处理LRSC以进行下游细胞分选                              | 20 |
| 如何用全血制备白膜层                                     | 21 |
| 如何通过氯化铵裂解从全血中制备多形核细胞                           | 22 |
| 如何使用EasySep™ Direct红细胞去除试剂在不裂解的情况下去除红细胞 (RBCs) | 23 |

## 细胞分选和储存方案

|                                      |    |
|--------------------------------------|----|
| 如何通过密度梯度离心从全血中分离单个核细胞                | 24 |
| 如何通过免疫密度梯度分离特定的细胞亚群                  | 25 |
| 如何从单个样本中依次分离多种细胞类型                   | 26 |
| 如何使用Easy 250 EasySep™磁极从大体积样本中分离免疫细胞 | 26 |
| 如何冻存外周血单个核细胞 (PBMCs)                 | 29 |
| 如何复苏冻存的原代细胞                          | 31 |

## 血液处理方案

### 如何处理白细胞单采术样本用于下游细胞分离

下面的[实验方案](#)概述了如何使用手动或自动免疫磁珠和无柱的[EasySep™](#)细胞分选试剂盒处理新鲜或冻存的白细胞单采术样本以进行细胞分选。使用免疫磁珠细胞分选后，未标记的细胞可立即用于下游分析。查看并选择我们的[EasySep™](#)试剂盒，分离您感兴趣的细胞。

#### 材料

- 白细胞单采术样本（例如[产品号 #70500](#)）\*
- 挂袋架
- 转移接口
- 无菌转移管
- 容器
- 50毫升聚丙烯锥形管（例如Falcon锥形管，50毫升，[产品号 #38010](#)）
- 细胞计数材料：
  - Hausser Scientific™ Bright-Line血细胞计数器（[产品号 #100-1181](#)）
  - 含3%乙酸的亚甲基蓝（[产品号 #07060](#)）或台盼蓝（[产品号 #07050](#)）
- D-PBS + 2% FBS，（[产品号 #07905](#)）
- 使用细胞分选试剂盒的[产品信息表](#)推荐的培养基。培养基应不含Ca++和Mg++：
  - EasySep™缓冲液（[产品号 #20144](#)）
  - RoboSep™缓冲液（[产品号 #20104](#)）
  - PBS + 2% FBS和1 mM EDTA
- 氯化铵溶液（[产品号 #07800](#)；可选）
- 细胞分选试剂和设备：
  - [EasySep™](#)细胞分选试剂盒（获得感兴趣的细胞）
  - EasySep™磁极（[磁极对比](#)）或[RoboSep™](#)细胞分选仪
  - [用于细胞分选的试管或培养瓶](#)

\*某些产品仅在特定地区销售。请通过[info.cn@stemcell.com](mailto:info.cn@stemcell.com)联系您的STEMCELL销售代表或技术支持团队，了解更多信息。

#### 实验方案

##### 开始前：

确保在生物安全柜内无菌处理白细胞单采术样本。

##### 注：

对于冻存的白细胞单采术样本，请按照推荐的解冻方案或使用[ThawSTAR® CB](#)来降低人为错误的风险并标准化细胞复苏流程。

更多的技巧请观看此[网络研讨会](#)。

#### 第一部分：将白细胞单采术样本转移到无菌容器中

1. 将白细胞单采术样本置于挂袋架上，打开袋子上的开口，然后插入转移接口。
2. 合上支架板，对袋子施加压力。
3. 打开阀门，通过无菌转移管将白细胞单采术样本转移到无菌容器中。如果您没有挂袋架，请向袋子施加压力或通过重力转移。

#### 第二部分：处理白细胞单采术样本

##### 开始前：

建议在任何处理或洗涤步骤之前对白细胞单采术样本进行初始细胞计数，并与洗涤步骤后的细胞数进行比较，用于计算细胞回收率。

##### 注：

- 如果您使用EasySep™试剂盒进行下游细胞分选，请查阅提供的产品信息表（PIS），以确定是否需要红细胞（RBCs）裂解和额外的血小板去除步骤。如果未提及或不需要红细胞裂解和额外的血小板去除步骤，请按照方法1中所述清洗白细胞单采术样本。如果EasySep™分选试剂盒需要进行红细胞裂解和血小板去除，请参阅方法2。
- 由于供体之间的差异，白细胞单采术样本中红细胞和血小板的含量可能会有所不同。完成方法1中的洗涤步骤后，可能需要额外的红细胞裂解步骤和额外的洗涤以去除血小板（方法2）。

### 方法1: 清洗白细胞单采术样本

1. 将白细胞单采术样本转移至无菌容器后, 向容器中添加等体积的缓冲液 (推荐PBS + 2% FBS)。
2. 将稀释的白细胞单采术样本等分到适合的试管中进行离心。我们建议使用50 mL锥形管进行离心。
3. 在室温 (15 - 25°C) 下将细胞以300 x g离心10分钟, 同时打开刹车。
4. 小心去除上清液, 不要碰到细胞沉淀。
5. 通过向样本中添加推荐的培养基来重悬细胞并计数。
6. 如果需要, 将不同试管中的所有细胞合并到一个试管中:
  - a. 使用少量的推荐培养基重悬细胞。
  - b. 将重悬的细胞合并至一个50 mL试管中。请使用推荐的培养基冲洗试管, 以尽可能多地回收细胞。

### 方法2: 红细胞裂解和血小板去除

1. 将白细胞单采术样本转移至无菌容器后, 以4:1的体积比向样本中添加氯化铵溶液。轻轻颠倒管子以混合均匀。
2. 在冰上孵育15分钟。
3. 在室温 (15 - 25°C) 下将样本以300 x g离心10分钟, 同时打开刹车。
4. 弃去上清液并重悬细胞。
5. 洗涤以去除血小板, 如下所示:
  - a. 用PBS + 2% FBS加满试管。在室温下以120 - 130 x g离心10分钟, 关闭刹车。
  - b. 弃去上清液。
  - c. 将细胞重悬于少量的推荐培养基中。
6. 如果需要额外去除血小板, 请重复步骤5的a至c, 进行1 - 2次额外的洗涤步骤。

### 第三部分: 细胞计数并准备进行细胞分选

1. 使用台盼蓝或含3%乙酸的亚甲基蓝进行细胞计数。有关细胞计数说明, 请参阅[如何使用血细胞计数器对细胞进行计数的实验方案](#)。
2. 使用以下公式计算将细胞重悬至所需浓度的总体积:

所需的总体积 = 样本中的细胞浓度 x 样本体积 / 所需的最终细胞浓度

#### 示例:

推荐培养基中所需的最终细胞浓度 =  $5 \times 10^7$  个细胞/mL

样本中的细胞浓度 =  $1.825 \times 10^7$  个细胞/mL

样本体积 = 40 mL

$(1.825 \times 10^7 \text{ 细胞/mL} \times 40 \text{ mL}) / 5 \times 10^7 \text{ 细胞/mL} = 14.6 \text{ mL}$

所需的总体积为14.6 mL。

3. 确定所需的体积后, 在室温 (15 - 25°C) 下以300 x g离心细胞10分钟, 同时打开刹车。
4. 弃去上清液, 使用合适体积的推荐培养基重悬细胞, 以获得所需的细胞浓度。

**注:** 若使用EasySep™进行手动分选或使用RoboSep™仪进行自动细胞分选, 请将细胞重悬于EasySep™缓冲液、RoboSep™缓冲液或PBS + 2% FBS和1 mM EDTA中。培养基应不含Ca<sup>++</sup>和Mg<sup>++</sup>。



#### 视频

如何处理新鲜或冻存的白细胞单采术样本以进行下游细胞分选

[www.stemcell.com/leukopak-video](http://www.stemcell.com/leukopak-video)



#### 网络研讨会

处理白细胞单采术样本的技巧

[www.stemcell.com/leukopak-webinar](http://www.stemcell.com/leukopak-webinar)

## 第四部分: 使用EasySep™或RoboSep™进行细胞分选

### 方法1: 手动细胞分选

1. 请按照所选EasySep™试剂盒的[产品信息表](#)中提供的说明进行操作。

为了从白细胞单采样本中有效分离免疫细胞, 我们建议使用可处理大体积样本的EasySep™磁极。

- Easy 50 EasySep™磁极 ([产品号 #18002](#)) 能处理多达40 mL和 $4 \times 10^9$ 个细胞的样本。
- Easy 250 EasySep™磁极 ([产品号 #100-0821](#)) 能处理多达225 mL和 $1.25 \times 10^{10}$ 个细胞的样本。
- 比较不同的[EasySep™磁极](#)。

### 方法2: 使用RoboSep™-S自动化细胞分选

1. 将细胞悬液 (以EasySep™产品信息表中所写的细胞浓度为准) 添加到14 mL (17 x 95 mm) 聚苯乙烯圆底试管中。
2. 在RoboSep™-S上选择相应的实验方案, 按照屏幕提示放置样本、试剂和枪头。
3. 按下RUN开始。
4. 运行完成后, 卸下转盘。分选获得的细胞可直接用于下游应用。

## 如何处理LRSC以进行下游细胞分选

下面的[方案](#)概述了如何处理LRSC, 以使用手动或自动免疫磁珠和无柱EasySep™细胞分选试剂盒分离细胞。使用免疫磁珠细胞分选后, 未标记的细胞可立即用于下游分析。

### 材料

- LRSC (如[产品号 #200-0093](#))
- 50 mL试管架 ([产品号 #200-0651](#))
- 50 mL聚丙烯锥形管 (如[产品号 #100-0090](#))
- D-PBS + 2% FBS, ([产品号 #07905](#))
- 热封灭菌袋中的灭菌剪刀
- 12 mL注射器
- 16号钝头针 ([产品号 #28110](#))
- 200  $\mu$ L枪头
- 血清移液管 (25 mL, 如[产品号 #38005](#), 10mL, 如[产品号 #38004](#))

### 开始前:

确保在生物安全柜内以无菌方式处理LRSC。

### 实验方案

1. 首先, 用70%异丙醇或乙醇仔细清洁LRSC的外表面。
2. 将LRSC宽边朝下放置在50 mL锥形管上 (收集管)。
3. 将LRSC固定在收集管上, 用无菌剪刀剪断位于滤器较宽一侧底部的软管, 留下大约2至3厘米的管道。
4. 将LRSC放回收集管上。然后剪断位于滤器较窄一侧顶部的软管, 留下大约1厘米的管道。样本将开始滴入收集管中。
5. 为了便于将样本完全转移到收集管中, 可以按如下方式进行空气冲洗:
  - a. 使用移液器将无菌的200  $\mu$ L枪头插入LRSC顶部的管口中。
  - b. 轻轻转动枪头几次以确保固定。
  - c. 将16号钝头针牢固地与12 mL注射器连接, 并使用注射器将空气推入200  $\mu$ L枪头。
  - d. 持续注入空气, 直至样本 (通常为8至10 mL) 完全转移至收集管中。
6. 接下来冲洗滤器, 请用注射器中吸取PBS + 2% FBS的缓冲溶液。通过200  $\mu$ L枪头以大约2 mL/秒的速度轻轻注入缓冲溶液。以圆周运动移动注射器, 以冲洗滤器侧面的样本。
7. 进行空气冲洗。
8. 额外重复清洗和空气冲洗步骤 (步骤6和7) 2次, 直至使用了约30 mL的缓冲溶液冲洗滤器。

### 注:

- 确保收集的清洗溶液不会接触滤器底部的软管。
- 最后一次空气冲洗后, 滤器的侧面看起来应该是清晰的。然后可以丢弃滤器。

9. 用PBS + 2% FBS将稀释后的样本补充至50 mL。
10. 盖紧试管, 并通过翻转试管5至6次轻轻混合稀释的样本。
11. 在刹车打开或减速设置为高的情况下, 以800 x g离心10分钟。

**注:** 小心不要破坏含有白细胞和红细胞的底层。

12. 离心后, 使用10 mL血清移液管小心去除上清液。

13. 轻轻地来回晃动试管以重悬样本 (~10 mL)。这些细胞现已准备好用于下游应用, 但对于某些EasySep™细胞分选方案可能需要额外的处理步骤。

**注:** 如果不立即使用, 细胞可在2 - 8°C下保存长达48小时。



#### 视频

如何从单采血小板滤器 (LRSC) 中回收细胞

[www.stemcell.com/LRS-video](http://www.stemcell.com/LRS-video)

## 如何从全血中制备白膜层

该方案描述了如何从全血样本中生成白膜层, 然后将其用于下游分析或使用免疫磁珠细胞分选技术 (例如EasySep™) 分离特定细胞群。

### 材料

- 全血样本 (采集后需添加抗凝剂)
- 根据您使用的细胞分选试剂盒的[产品说明书](#)推荐的试剂, 包括:
  - EasySep™ 缓冲液 ([产品号#20144](#))
  - RoboSep™ 缓冲液 ([产品号#20104](#))
  - 含有2%胎牛血清的磷酸盐缓冲溶液 (PBS + 2% FBS, [产品号 #07905](#))
- [离心管](#)

### 实验方案

1. 在全血样本中加入等量的推荐试剂, 轻轻混合。
2. 室温下 (15 - 25°C), 800 x g, 离心10分钟 (离心速度需缓缓升降)。
3. 吸取浓缩的白细胞层 (即白膜层), 加上一小部分血浆和浓缩的红细胞 (RBCs)。其目的是浓缩白细胞至大约5倍, 同时保持白细胞和RBCs的等比例 (例如, 当起始全血为10 mL时, 可收集2 mL的白膜层)。

**注:** 尽管RosetteSep™和大多数EasySep™ Direct试剂盒已优化可直接用于全外周血, 但只需满足以下条件, 就可以从白膜层中富集细胞:

- 样本中每含一个有核细胞, 则至少含100个RBCs。
- 样本中有核细胞的浓度不超过 $5 \times 10^7$ 细胞/mL。

STEMCELL Technologies提供各种工具和产品, 用于从全血、白膜层、脾脏和淋巴结分离细胞, 并且不受一定RBC比例或细胞浓度的限制。[了解更多关于从血液样本高效分离细胞的技术。](#)



# 如何使用氯化铵裂解从全血中制备多形核细胞

该[方案](#)描述了如何使用密度梯度离心从全血中分离多形核细胞，然后用氯化铵溶液对红细胞（RBCs）裂解。要了解有关从血液中分离细胞的更多信息，请参阅我们的[细胞分选电子书](#)。

## 材料

- [含有抗凝剂的全血\\*](#)
- 离心管（如Falcon®圆底聚苯乙烯试管，5 mL，[产品号 #38007](#)；Falcon®圆底试管，14 mL，[产品号 #38008](#)；或Falcon®锥形管，50 mL，[产品号 #38010](#)）
- Lymphoprep™（[产品号 #07801](#)）
- 含有2%胎牛血清的磷酸盐缓冲溶液（PBS + 2% FBS，[产品号 #07905](#)）
- 氯化铵溶液（[产品号 #07800](#)）

\*某些产品仅在部分地区销售。请通过[info.cn@stemcell.com](mailto:info.cn@stemcell.com)联系您的STEMCELL销售代表或技术支持团队，了解更多信息。

## 实验方案

1. 将Lymphoprep™添加到离心管中。请参见表1了解各种试管大小对应的推荐添加体积。
2. 用等量的PBS + 2% FBS或其他合适的培养基稀释全血。
3. 将稀释的血液小心地加到Lymphoprep™上方，尽量减少血液与Lymphoprep™混合。
4. 在室温（15 - 25℃）下以800 x g离心20分钟，关闭刹车。
5. 取出并弃去血浆层、单个核细胞层和Lymphoprep™，完好地留下红细胞/粒细胞沉淀。

**可选:** 可以将沉淀转移到新试管中，以避免管中残留的单个核细胞污染沉淀。

表1. 推荐体积和试管规格

| 血 (mL) | PBS + 2% FBS (mL) | Lymphoprep™ (mL) | 试管规格 (mL) |
|--------|-------------------|------------------|-----------|
| 1      | 1                 | 1.5              | 5         |
| 2      | 2                 | 3                | 14        |
| 3      | 3                 | 3                | 14        |
| 4      | 4                 | 4                | 14        |
| 5      | 5                 | 10               | 50        |
| 10     | 10                | 15               | 50        |
| 15     | 15                | 15               | 50        |

6. 将氯化铵溶液添加到红细胞沉淀中直至完全充满试管。在冰上孵育10分钟。
7. 在室温下以300 x g离心10分钟，并将刹车设置为低。
8. 取出并弃去上清液。添加PBS + 2% FBS以重新悬浮沉淀，然后在室温下以120 x g离心10分钟（关闭刹车）。
9. 取出并弃去上清液。将得到的多形核细胞重悬于适当的培养基（例如PBS + 2% FBS）中。

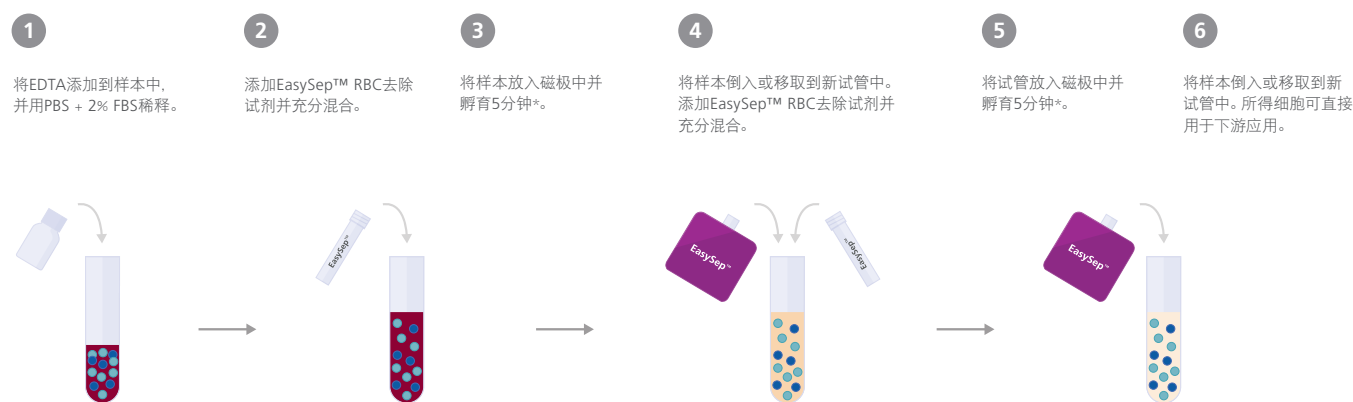
[细胞分选试剂盒](#)可用于总粒细胞的正选、去除和负选，以及从全血或多形核细胞中负选中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞。

## 如何使用EasySep™ RBC去除试剂在不裂解的情况下去除红细胞（RBCs）

在许多实验室中，从人全血样本中获取白细胞的标准方案包括密度梯度离心或用氯化铵裂解红细胞（RBCs）。然而，这些方法可能耗时、难以自动化，并且可能存在残留的细胞碎片，从而改变细胞功能或干扰下游检测。

STEMCELL Technologies开发了一种简便的方案，EasySep™ RBC去除试剂通过免疫磁珠去除红细胞，无需裂解、清洗或离心步骤。得到的白细胞为高纯度且无标记，可直接用于下游应用，包括细胞培养、RNA分离或酶活性检测。EasySep™ RBC去除试剂还可用于脐带血、骨髓、白膜层或白细胞单采产品，以满足您的各类需求。

### EasySep™ RBC去除试剂方案



\*孵育时间将根据样本和使用的EasySep™磁极而有所不同。

访问[www.stemcell.com/RBCdepletion](http://www.stemcell.com/RBCdepletion)查看更多信息。

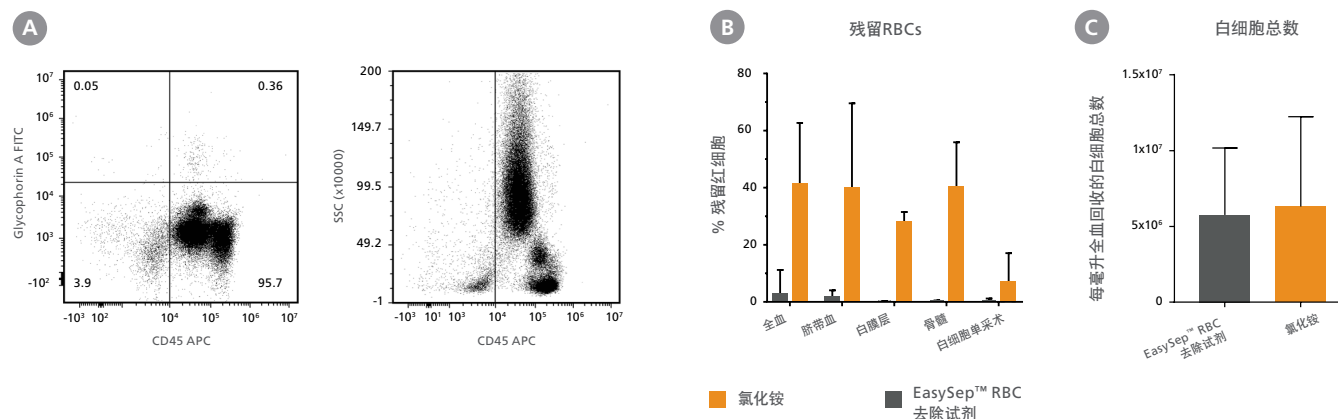


图11. 与氯化铵裂解相比，EasySep™ RBC去除试剂可提供良好的红细胞去除效果

使用氯化铵（ $\text{NH}_4\text{Cl}$ ）裂解或使用EasySep™ RBC去除试剂对来自正常健康供体的不同样本进行红细胞去除。去除红细胞后，用荧光染料偶联的抗CD45和抗Glycophorin A抗体对样本染色，并通过流式细胞术分析。以Glycophorin A<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>表型代表残留的红细胞。（A）流式分析表明使用EasySep™ RBC去除试剂（未设门）去除红细胞后人全血样本中残留的红细胞。残留红细胞的通常百分比为 $2 \pm 3\%$ （平均值±标准偏差； $n = 31$ ）。在上图中，残留红细胞含量为0.05%。（B）使用EasySep™ RBC去除试剂后，各种样本中残留红细胞的百分比明显低于用氯化铵处理的样本（平均值±标准偏差； $n = 31$ ）。（C）使用氯化铵裂解红细胞和使用EasySep™红细胞去除试剂去除红细胞后，从全血样本中回收的白细胞总数相当（平均值±标准偏差； $n = 37$ ）。

# 细胞分选和冻存方案

## 如何通过密度梯度离心从全血中分离单个核细胞

该方案描述了如何使用密度梯度离心从全血中分离单个核细胞，例如外周血单个核细胞 (PBMCs)。

访问链接观看操作视频  
[www.stemcell.com/mononuclear-cell-isolation](http://www.stemcell.com/mononuclear-cell-isolation).

### 材料

- 全血样本
- 密度梯度离心液 (如Lymphoprep™, [产品号 #07801](#))
- 含2%胎牛血清的磷酸盐缓冲液 (PBS + 2% FBS, [产品号 #07905](#)), 或其他适当的溶液
- 离心管 (如Falcon®圆底聚苯乙烯试管, 5 mL, [产品号 #38007](#); Falcon®圆底试管, 14 mL, [产品号 #38008](#); 或Falcon®锥形管, 50 mL, [产品号 #38010](#))

### 实验方案

实验开始之前:  
确保所有试剂处于室温 (15 - 25°C)。

- 使用适当的培养基溶液或PBS + 2% FBS按1:1的体积比例稀释血液样本。
- 根据说明书加入一定体积的密度梯度离心液至一个新的试管中。若使用的是Lymphoprep™, 查看表2中推荐的离心液体积和试管规格。
- 轻轻地将稀释的血液加至密度梯度离心液面上。注意尽量避免混合。
- 以800 x g离心20-30分钟, 关闭刹车。

表2. 使用Lymphoprep™进行密度梯度离心的推荐体积和试管规格

| 血 (mL) | PBS + 2% FBS (mL) | Lymphoprep™ (mL) | 试管规格 (mL) |
|--------|-------------------|------------------|-----------|
| 1      | 1                 | 1.5              | 5         |
| 2      | 2                 | 3                | 14        |
| 3      | 3                 | 3                | 14        |
| 4      | 4                 | 4                | 14        |
| 5      | 5                 | 10               | 50        |
| 10     | 10                | 15               | 50        |
| 15     | 15                | 15               | 50        |

- 将移液器枪头直接穿过上层的血浆层, 小心地收集中间界面的单个核细胞。或者, 您可以先去除上层的血浆再收集细胞。
- 用适当的缓冲液清洗收集的细胞两次。清洗后的细胞能立即用于下游应用。



### 加速PBMC分选

使用SepMate™只需15分钟即可获得PBMCs。SepMate™包含一个插件, 可快速将血液加入至密度梯度离心液上并防止各层混合。在打开刹车的情况下离心, 然后轻松地将分离的PBMCs倒入新试管中。

[www.SepMate.com](http://www.SepMate.com)

# 如何通过免疫密度梯度分离特定细胞亚群

该方案描述了如何使用RosetteSep™从全血中分离细胞，RosetteSep™是一种免疫密度梯度细胞分选试剂，可在密度梯度离心过程中分离特定的细胞亚群。RosetteSep™首先将不需要的细胞与样本中存在的红细胞（RBCs）交联，形成免疫玫瑰花结。免疫玫瑰花结在密度梯度离心过程中会沉淀，使高纯度的目的细胞留在血浆和密度梯度离心液之间的界面。下述为使用RosetteSep™抗体混合物分离特定细胞类型的常规实验步骤；具体的实验条件根据需要富集的细胞类型可能有所不同。

## 材料

- 全血样本
- 用于您目的细胞亚群的RosetteSep™抗体混合物
- 含2%胎牛血清的磷酸盐缓冲液（PBS + 2% FBS，如含2%胎牛血清的Dulbecco's磷酸盐缓冲液，产品号 #07905）
- 密度梯度离心液（如Lymphoprep™，产品号 #07801）

## 实验方案

**开始之前：**  
确保血液样本，PBS + 2% FBS，密度梯度离心液以及离心机均处于室温（15-25℃）。

1. 在样本中加入RosetteSep™混合物并混合均匀。室温下（15-25℃）孵育20分钟。
2. 用等体积的PBS+2% FBS稀释样本并轻轻混匀。将稀释的样本加于密度梯度离心液之上（推荐使用的样本和密度梯度离心液体积请见表3）。请注意尽量避免密度梯度离心液和样本混在一起。

表3. 使用Lymphoprep™进行密度梯度离心的推荐体积和试管规格

| 样本体积 (mL) | 试管规格 (mL) | PBS + 2% FBS (mL) | 密度梯度离心液 (mL) |
|-----------|-----------|-------------------|--------------|
| 1         | 5         | 1                 | 1.5          |
| 2         | 14        | 2                 | 3            |
| 3         | 14        | 3                 | 3            |
| 4         | 14        | 4                 | 4            |
| 5         | 50        | 5                 | 15           |
| 10        | 50        | 10                | 15           |
| 15        | 50        | 15                | 15           |

3. 在室温下1200 x g离心20分钟，关闭刹车。  
**小窍门：**使用SepMate™可将离心时间缩短至10分钟（开启刹车）。
4. 从密度梯度离心液和血浆之间的界面收集富集的细胞。加入PBS + 2% FBS清洗细胞，并重复此步骤。

**注：**有时会较难分辨中间界面的细胞，特别是在富集稀有细胞时；在这种情况下，可采用以下方法以最大化回收率。

## 最大化回收稀有细胞的操作步骤：

- a. 收集富集细胞的同时收集一些密度梯度离心液。
- b. 加入PBS + 2% FBS。300 x g离心10分钟，低速下开启离心机刹车。弃去上清液，重复上述步骤。富集的细胞可立即用于下游应用。

## 如何从单个样本中分离多种细胞类型

针对从少量样本中分离多种细胞的情况，需要进行[依次分选](#)，提高细胞的回收率。依次分选适用于嵌合体分析（仅使用少量血液样本，从单一起始样本分离出多种细胞进行谱系特定分析）。

我们大部分的依次分选流程可以从单一样本中分离出三种细胞，如下：

1. 首先用抗体标记需要分离的第一种细胞，被标记的细胞与磁珠相连，吸附在磁极上。含有未经标记的细胞的上清液被转移至新的试管中，用于第二步的细胞分选。
2. 从第一步分选得到的未经标记的细胞悬液可用针对第二种细胞的抗体进行标记。这些标记的细胞如上所述进行分离，而上清液再次被移至新的流式管中，用于最后一步的细胞分选。
3. 以相同的方式分离第三种细胞，剩余上清液被倾倒后可弃掉。

这个方法适用于几乎所有的细胞组合。STEMCELL Technologies专注于为HLA实验室提供各种优化的方案，但该技术还可用于其他应用。

### 依次分选的技术窍门

正选只能使用未经标记的细胞，例如（1）起始样本，（2）正选后倾倒入出的细胞悬液，或（3）负选后倾倒入出的细胞悬液（含富集的细胞群）。

我们推荐先从含量最少的细胞开始（为了减少细胞损失），然后再分离含量较多的细胞（有时这种方法不适用，针对具体的情况请联系我们）。

### 依次分选的优势

- 可用于体积小的起始样本
- 最大化细胞回收率
- 可快速简便地分离多种细胞
- 可采用[RoboSep™](#)进行自动化细胞分选，避免交叉污染

## 如何使用Easy 250 EasySep™磁极从大体积样本中分离免疫细胞

使用[Easy 250 EasySep™磁极](#)以及标准T-75 cm<sup>2</sup>细胞培养瓶和EasySep™试剂，可以扩大从大体积样本（例如白细胞单采术样本和全血样本）中进行手动细胞分选的规模。本[实验方案](#)阐述了使用Easy 250 EasySep™磁极和T-75 cm<sup>2</sup>培养瓶时的步骤和关键注意事项。请参阅下表4，了解T-75 cm<sup>2</sup>培养瓶与Easy 250 EasySep™磁极的兼容性以及使用该磁极进行手动细胞分选时的关键技术和注意事项。

表4. T-75 cm<sup>2</sup>培养瓶与Easy 250 EasySep™磁极的兼容性

| 兼容性         | 品牌               | 产品号 #                                                                      |
|-------------|------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| 兼容（官方推荐）    | Corning®         | 353135 (密封帽)/<br>STEMCELL #200-0500<br>353136 (通风帽)/<br>STEMCELL #200-0501 |
| 兼容（合适的替代方案） | Greiner Bio-One  | 658170                                                                     |
| 不兼容（不推荐）    | BioLife (Thermo) | 130190<br>130193                                                           |
|             | CellTreat®       | 229340<br>229341                                                           |
|             | VWR              | 10062-862<br>10062-860                                                     |
|             | Corning®/Falcon  | 353110                                                                     |

**注意：**此表仅包括经兼容性测试的T-75 cm<sup>2</sup>培养瓶。如果您的培养瓶类型未在上面列出，我们建议首先进行测试，以确认该培养瓶与我们的Easy 250 EasySep™磁极的兼容性。培养瓶容量应可容纳最多250 mL体积，并且可使用25 mL血清移液管（例如[产品号 #38005](#)）进行混合和体积收集。

STEMCELL可根据需求提供定制化服务。

请联系[info.cn@stemcell.com](mailto:info.cn@stemcell.com)以获取更多信息。

## 调整底座平台高度以适配T-75 cm<sup>2</sup>培养瓶

1. 将Easy 250 EasySep™磁极放在平面上, 并确保侧边弹簧侧已推至底部, 以便T-75 cm<sup>2</sup>培养瓶可以轻松放到磁极中。
2. 如果是第一次将此磁极与特定类型的培养瓶一起使用, 请检查是否需要调整底座平台高度。为此:
  - a. 将T-75 cm<sup>2</sup>培养瓶放入磁极中, 以确定底座平台高度升高或降低的幅度 (如有必要)。将瓶肩与磁极顶部齐平, 以使瓶盖和瓶颈不会受到磁极的阻碍。
  - b. 一旦确定了合适的高度, 取出培养瓶。
  - c. 将磁极侧放, 并使用螺丝刀调整高度。
  - d. 若要升高底座平台, 请使用螺丝刀逆时针转动磁极底部的驱动螺栓。若要降低平台, 请顺时针旋转驱动螺栓。注意不要将驱动螺栓拧得过紧。
  - e. 调整底座高度后, 将培养瓶放回磁极中, 检查T-75 cm<sup>2</sup>培养瓶的肩部是否与磁极顶部齐平。
  - f. 如有需要, 进一步调整高度。
  - g. 调整完成后, 将磁极放入磁极架中开始细胞分选流程。

## 添加细胞分选抗体混合物、磁珠 (RapidSpheres™) 和缓冲液

1. 按照所用试剂盒的产品信息表 (PIS) 中所示的体积添加抗体混合物。
  - a. 使用血清移液管将抗体混合物直接添加到样本中, 然后轻轻地吹打2 - 3次。
  - b. 盖上瓶盖。搅拌并旋转数次以充分混合。
2. 样本混匀后, 按照PIS中提供的建议时间进行孵育。
3. 将磁珠涡旋至少30秒。
4. 抗体混合物孵育完成后, 按照所用试剂盒的PIS中所示的体积添加磁珠。
  - a. 使用血清移液管将磁珠直接添加到样本中, 并轻轻地上下吹打2 - 3次。
  - b. 盖上瓶盖。搅拌并旋转数次以充分混合。
5. 样本混合后, 按照PIS中的建议时间进行孵育。
6. 孵育后, 按照所用试剂盒PIS中所示的体积添加EasySep™缓冲液或推荐缓冲液。
7. 盖上瓶盖。搅拌并旋转数次以充分混合。

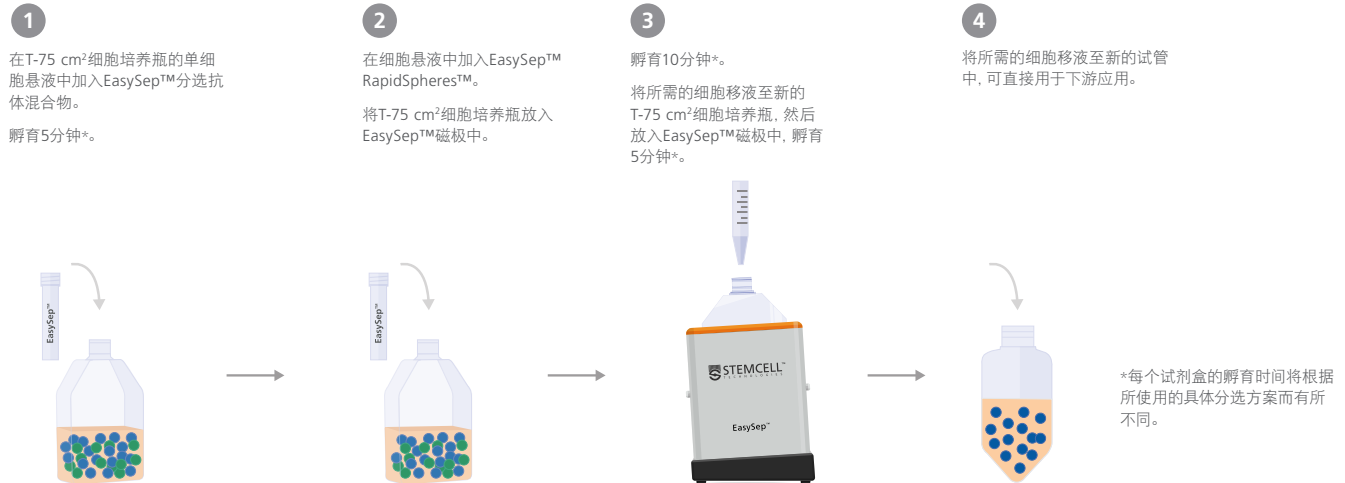


图12. 使用Easy 250 EasySep™磁极从大体积样本中分离免疫细胞

8. 样本混合后, 将磁极放在支架上, 然后将磁极的侧边弹簧推至底部, 以便培养瓶可以轻松放入。
9. 将培养瓶放入磁极并按下侧面的两个按钮, 以释放弹簧并将培养瓶紧紧地固定在磁极中。
10. 取下盖子, 并按照PIS中所示的时间将培养瓶置于磁极中孵育。

## 收集上清液

一旦达到分选时间, 即可收集上清液。

### 注:

- 当使用EasySep™负选试剂盒分离细胞时, 目的细胞将出现在上清液中; 因此, 应保留上清液。
- 当使用EasySep™正选试剂盒分离细胞时, 目的细胞会吸附在培养瓶的侧面, 位于磁极中; 因此, 可以弃去上清液。

1. 用手扶住培养瓶使其固定在磁极中, 使用25 mL血清移液管吸出上清液并最大程度地提高上清液回收率。
2. 垂直插入移液管, 从培养瓶液面正下方开始吸取, 然后保持移液管尖端在液面下方, 轻轻地左右扫动吸取, 注意不要碰到培养瓶的侧面。
3. 取出大部分上清液后, 使用容量较小的血清移液管吸取剩余上清液。
4. 吸出残余上清液后, 盖上T-75 cm<sup>2</sup>培养瓶的盖子, 然后推动磁极的侧边弹簧, 以便回收培养瓶。

## 重悬培养瓶内被标记的细胞

当使用EasySep™正选试剂盒时, 根据PIS重悬正选的细胞, 并重复几次磁珠分选步骤。为此:

1. 使用较大的血清移液管(例如25mL)将指定体积的EasySep™缓冲液添加到培养瓶中。均匀地将缓冲液沿着两侧加到培养瓶中, 并在每次添加缓冲液后彻底混合细胞以重悬。
2. 为了从培养瓶边缘完全重悬细胞, 请使用较小的血清移液管。
3. 盖上瓶盖。转动瓶身数次以充分混合。
4. 立即将培养瓶放入Easy 250 EasySep™磁极中。
5. 按下磁极侧面的两个按钮, 释放弹簧, 并将培养瓶紧紧地固定在磁极中。
6. 取下盖子, 并按照PIS中所示的时间将培养瓶置于磁极中孵育。

**注:** 这些步骤应按PIS中规定的必要次数进行重复。

7. 完成后, 可以使用所需体积(例如50 mL)重悬细胞, 然后将其转移至50 mL试管中以用于进一步的下游应用。

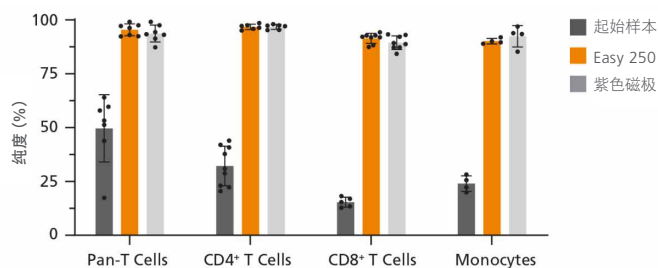


图13. 使用Easy 250 EasySep™磁极可分离高纯度的目的细胞

使用相应的EasySep™负选试剂盒从处理过的白细胞单采样本中分离出人免疫细胞。使用Easy 250 EasySep™磁极 (Easy 250) 和EasySep™磁极 (紫色) 在分离前 (开始) 和分离后检测细胞纯度。通过使用Pan-T细胞 (CD3<sup>+</sup>)、CD4<sup>+</sup> T细胞 (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>)、CD8<sup>+</sup> T细胞 (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) 或单核细胞 (CD14<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>) 的细胞表面标志物来评估纯度, 并通过流式细胞术进行分析 (平均值±标准偏差; n = 4 - 12)。



## 如何冻存外周血单个核细胞 (PBMCs)

冻存是长期储存细胞的常用方法, 包括从[全血](#)或[白细胞单采术样本](#)中分离的人外周血单个核细胞 (PBMCs)。为了冻存PBMCs, 将细胞重悬于冻存液中, 冷却至极低温度, 然后储存在液氮 (低于 -135°C) 中。当需要使用细胞时, 可以将冻存的PBMCs复苏, 然后用于下游应用, 如使用[EasySep™](#)进一步分离细胞亚群。

自配的冻存液通常含有胎牛血清 (FBS), 这是一种营养丰富的成分, 可以保护细胞并帮助它们在解冻后恢复。然而, 胎牛血清的使用可能引发批次间差异和传播潜在污染源风险。通常不建议将胎牛血清用于商业或临床应用, 例如生物制剂的生产。二甲亚砜 (DMSO) 是另一种有助于保护细胞免受渗透裂解的添加剂, 也是冻存液中广泛使用的冷冻保护剂。

使用合适的冻存液、细胞浓度和冷冻速率可确保PBMCs在复苏后保持最佳的活力和功能。以下[方案](#)概述了用于成功冻存纯化的PBMCs的两种选择:

- **使用无血清的冻存液:**

CryoStor® CS10 ([产品号 #07930](#)), 是一种无血清、无动物成分的, 含10% DMSO的冻存液。能在冷冻、储存以及复苏过程中为细胞提供一个安全的、保护性的环境。

- **使用含血清的配方:**

含10% DMSO和90% FBS的实验室自配溶液是一种常用的、经济的且有效的冻存液。

### 材料

- 冻存液 (如CryoStor® CS10, [产品号 #07930](#); DMSO和FBS)
- 冻存管 (如产品号 [#38053](#))
- 梯度降温盒 (如Nalgene® Mr. Frosty, Sigma Aldrich 产品号 #C1562) 或程序降温仪
- 不含异丙醇的冷冻容器 (CoolCell® LXCoring®, [产品号 #200-0642](#))
- 移液器 (如Corning® Lambda™ Plus移液器, [产品号 #38060](#))
- 移液器枪头 (如Corning®滤芯移液器枪头, [产品号 #38034](#))

## 实验方案

### 方案一: 使用CryoStor® CS10冻存细胞

1. 打开CryoStor® CS10之前, 用70%的乙醇或异丙醇擦拭外包装。
2. 标记冻存管。
3. 确保PBMCs为单细胞悬液。300 x g离心10分钟, 以获得细胞沉淀。
4. 使用移液器小心去除上清液, 保留少量溶液确保细胞沉淀不被吸取。
5. 轻轻敲打管壁重悬细胞沉淀。
6. 加入冷却的 (2 - 8°C) CryoStor® CS10, 彻底混合, 将悬液转移至冻存管中。

**注:** 推荐将PBMCs按0.5 - 10 x 10<sup>6</sup>细胞/mL的浓度进行冻存。然而, 您可以尝试按不同的浓度冻存细胞, 来确定复苏后能维持最佳细胞活率、回收率以及功能性的浓度。由于最主要的风险在于活细胞的损失, 因此对于一些特殊应用, 应验证并优化冻存的最佳细胞浓度。

7. 在2 - 8°C下, 孵育细胞10分钟。
8. 在程序降温仪或梯度降温盒 (如Nalgene® Mr. Frosty) 中采用标准的慢速降温程序 (大约-1°C/分钟) 冻存细胞。若使用梯度降温盒, 将冻存管放入盒中, 并在-80°C的冰箱中放置过夜。
9. 若长期储存, 需将冻存的PBMCs管从冰箱或冷冻器中转移至液氮 (低于-135°C)。转移至液氮时需将冻存管置于干冰中以尽量减少其暴露在室温下的时间。

**注:** 不推荐在-80°C下进行长期保存。

## 方案二: 在10% DMSO和90% FBS中冻存细胞

### 开始之前:

- 实验开始之前确保所有试剂已冷却。
- 若使用FBS存在安全问题, 应使用不含血清和动物成分的冻存液, 如CryoStor® CS10。

1. 制备含20% DMSO的FBS溶液, 保存于冰上。

**注:** 请勿直接将100% DMSO置于冰上, 否则会形成晶体。请使用玻璃移液器添加DMSO。

2. 标记冻存管。
3. 确保PBMCs为单细胞悬液。300 x g离心10分钟, 以获得细胞沉淀。
4. 使用移液器小心去除上清液, 保留少量溶液确保细胞沉淀不被吸取。
5. 按1 - 20 x 10<sup>6</sup>细胞/mL的浓度将PBMCs重悬于冷的FBS中, 置于冰上。
6. 按1:1的比例将细胞和含20%DMSO的FBS混合。最终细胞悬液中将有10%的DMSO和90%的FBS。最终的细胞浓度为0.5 - 10 x 10<sup>6</sup>细胞/mL。快速转移1 mL的细胞悬液至各冻存管。

**注:** 您可以尝试按不同的浓度来冻存细胞, 来确定复苏后能维持最佳细胞活率、回收率以及功能性的浓度。

7. 将冻存管立即放入梯度降温盒 (如Nalgene® Mr.Frosty) 中, 并在-80°C的冰箱中放置过夜。

**注:** 勿在室温下放置保存有细胞的冻存液。请将其保存于冰上并快速转移。

8. 若长期储存, 需将冻存的PBMCs管从冰箱或冷冻器中转移至液氮 (低于-135°C)。转移至液氮时需将冻存管置于干冰中以尽量减少其暴露在室温下的时间。

**注:** 不推荐在-80°C下进行长期保存。

## 如何复苏冻存的原代细胞

如果不需要立即使用, [人原代细胞](#)通常会被冻存在液氮中长期储存。若新鲜样本有限, 研究人员也可以购买[冻存的、即用型原代细胞](#), 包括单个核细胞、纯化的免疫细胞或造血干细胞。复苏冻存的细胞时, 合适的技术和处理能够确保用于下游应用的细胞保持最佳活力、回收率和功能。

该[方案](#)描述了如何复苏冻存的原代细胞。由于特定细胞的复苏方案可能有所不同, 因此请务必参考细胞对应的推荐方案。

或者可使用ThawSTAR® CFT2和ThawSTAR® CB自动解冻系统取代手动水浴解冻, 使该过程自动化并消除污染风险。ThawSTAR®不仅消除了污染风险, 而且提供受控的解冻曲线。ThawSTAR® CFT2和ThawSTAR® CB分别适用于冻存管和冻存袋。为了避免细胞受到瞬时升温的影响, 请在冻存样本运输过程中使用[ThawSTAR® CFT2 Transporter](#)。

### 材料

- [人原代细胞](#) (冻存)
- 推荐的培养基包括:
  - 添加了10%胎牛血清 (FBS) 的IMDM ([产品号 #36150](#))
  - 含有4500 mg/L D-葡萄糖 ([产品号 #36250](#)) 并添加10% FBS的DMEM
  - 添加了10% FBS的RPMI 1640培养基 ([产品号 #36750](#))
  - 含2% FBS的磷酸盐缓冲液 (例如, 含2%胎牛血清的DPBS, [产品号 #07905](#))
- 2 mL血清移液管 (如Falcon®血清移液管, 2 mL, [产品号 #38002](#))
- 25 mL血清移液管 (如Falcon®血清移液管, 25 mL, [产品号 #38005](#))
- 50 mL锥形管 (如Falcon®锥形管, 50 mL, [产品号 #38010](#))
- DNase I 溶液 (1 mg/mL) ([产品号 #07900](#))
- 血细胞计数器 (例如Neubauer Hemocytometer) 和盖玻片
- 台盼蓝 ([产品号 #07050](#))
- 移液器 (例如Corning®Lambda™ Plus Pippette, [产品号 #38060](#))
- 枪头 (例如Corning®过滤枪头, [产品号 #38034](#))

## 实验方案

### 第I部分: 准备工作

**注:** 建议一次仅复苏1管冻存细胞, 以防止细胞在较高温度下长时间暴露于DMSO。

1. 在37°C的水浴中加热培养基。如果细胞复苏后需要进行下游[细胞分选](#), 则可以使用含2%FBS的PBS。
2. 当取出冻存细胞时, 请尽可能减少细胞暴露于室温 (15-25°C) 的时间。如果没有立刻进行复苏, 请将细胞放在干冰或液氮容器中。

### 第II部分: 细胞复苏

3. 用70%乙醇或异丙醇擦拭冻存管的外部。

**注:** 请快速地执行以下步骤以确保细胞的高活力和回收率。

4. 在生物安全柜中, 将冻存管盖拧开四分之一以减轻内部压力, 然后重新拧紧。
5. 通过轻轻旋转冻存管在37°C的水浴中快速复苏细胞。当冻存管中只残留少量冰时从水浴中取出, 该过程大约1-2分钟。请勿涡旋细胞。

### 第III部分: 细胞清洗与计数

6. 再次用70%乙醇或异丙醇擦拭冻存管的外部。
7. 在生物安全柜中, 使用2 mL血清移液管测量细胞悬液的总体积。该数值将在步骤13中用于计算细胞数量。
8. 取20 µL等分的细胞悬液进行计数。如果使用台盼蓝来评估细胞活力: 对于 $\geq 1 \times 10^6$ 个细胞, 请添加至少20 µL培养基并记录加入的培养基体积; 对于 $< 1 \times 10^6$ 的细胞, 直接将细胞稀释在20 µl的台盼蓝中。将稀释的细胞悬液静置直至步骤13。有关使用血细胞计数器的更多详细信息, 请参阅以下方案: [如何用血细胞计数器计数细胞](#)

**重要:** 复苏后收集的细胞悬液必须进行活细胞计数 (清洗前)。这可以确认初始细胞数量并在清洗过程中计算细胞损失。在清洗期间, 预计细胞的损失最多为30%。

9. 用移液器将剩余的细胞悬液转移到50 mL锥形管中。
10. 用1 mL培养基冲洗冻存管, 然后将其一起加入50 mL试管中, 同时轻轻旋转。

11. 通过一滴滴地加入15-20 mL的培养基来清洗细胞, 同时轻轻旋转试管。
12. 在室温 (15 - 25°C) 下将细胞悬液以300 x g离心10分钟。
13. 如果使用台盼蓝, 请对步骤8中稀释的细胞悬液进行细胞计数。
14. 用移液器小心地除去上清液 (来自步骤12), 留下少量培养基以确保细胞沉淀不受干扰。轻弹试管, 重悬细胞沉淀。
15. 如果细胞开始结块, 则每毫升细胞悬液中添加100 µg DNase I 溶液, 并在室温下孵育15分钟。

**注:** 如果细胞将用于DNA或RNA提取, 请勿添加DNase I溶液。

16. 轻轻地将15 - 20 mL培养基添加到试管中。
17. 细胞悬液在室温下以300 x g离心10分钟。
18. 用移液器小心地除去上清液, 留下少量培养基以确保细胞沉淀不受干扰。轻弹试管, 重悬细胞沉淀。
19. 这些细胞可直接用于下游应用, 例如使用MethoCult™或ImmunoCult™进行细胞培养, 以及使用EasySep™进行细胞分选。



## 标准化地复苏细胞

使用便携式ThawSTAR® CFT2获得可重复的复苏曲线。冻存管可直接在生物安全柜中解冻, 消除了污染风险并确保细胞复苏的一致性。

[www.stemcell.com/products/thawstar-cft2-automated-thawing-system.html](http://www.stemcell.com/products/thawstar-cft2-automated-thawing-system.html)



### 视频

如何复苏冻存的人原代细胞

[www.stemcell.com/thawing-protocol](http://www.stemcell.com/thawing-protocol)



### 视频

如何使用ThawSTAR® CFT2快速复苏细胞

[www.stemcell.com/thawstarcft2-video](http://www.stemcell.com/thawstarcft2-video)

# 精选产品

以下是用于血液样本制备、细胞分选和分析的精选产品列表。如需完整的产品清单, 请访问[www.stemcell.com](http://www.stemcell.com)。

## 人原代细胞\*

| 产品               | 产品号 #                                                              |
|------------------|--------------------------------------------------------------------|
| 人外周血白细胞单采样本 (冻存) | 200-0130                                                           |
| LRSC             | 200-0093                                                           |
| 人全外周血            | 70504 (ACDA)<br>70501 (CP2D)<br>70508 (EDTA)<br>70507 (Na Heparin) |
| 人外周血单个核细胞 (冻存)   | 70025                                                              |

\*某些产品仅在特定地区可售。

## 密度梯度离心液、冻存液、缓冲液和其他试剂

| 产品                                       | 产品号 #    |
|------------------------------------------|----------|
| Lymphoprep™                              | 07801    |
| CryoStor® CS10                           | 100-1061 |
| BloodStor® 55-5                          | 07937    |
| 含2%胎牛血清的Dulbecco's 磷酸盐缓冲液 (PBS + 2% FBS) | 07905    |
| 氯化铵溶液                                    | 07800    |
| Corning® CoolCell® LX细胞冷冻容器              | 200-0642 |

## 抗体

使用正确的抗体是研究的关键步骤。通过从一系列经过验证可与我们的细胞分选和细胞培养试剂配合使用的高质量一抗和二抗中进行选择, 确保您的下游细胞分析 (包括表型分析和纯度评估) 具有一致性\*。

访问[www.stemcell.com/antibodies](http://www.stemcell.com/antibodies)查看更多信息。

\*STEMCELL Technologies的抗体经过验证, 可与STEMCELL的细胞分选产品一起用于特定应用。请参阅产品信息表以获取应用的完整列表。

## 细胞分选和去除试剂

| 产品                           | 产品号 #                                                |
|------------------------------|------------------------------------------------------|
| EasySep™ Direct人T细胞分选试剂盒     | 19661                                                |
| EasySep™ Direct人B细胞分选试剂盒     | 19674                                                |
| EasySep™ Direct人PBMC细胞分选试剂盒  | 19654                                                |
| EasySep™ Direct人粒细胞分选试剂盒     | 19659                                                |
| EasySep™ RBC去除试剂             | 18170                                                |
| SepMate-15™                  | 85415 (IVD) <sup>1</sup><br>86415 (RUO) <sup>2</sup> |
| SepMate-50™                  | 85450 (IVD) <sup>1</sup><br>86450 (RUO) <sup>2</sup> |
| 用于HLA分析的细胞分选产品               |                                                      |
| EasySep™ Direct HLA T细胞分选试剂盒 | 89671                                                |
| EasySep™ 血清学全血CD3正选试剂盒       | 18981                                                |
| EasySep™ Direct HLA B细胞分选试剂盒 | 89684                                                |
| EasySep™ 血清学全血CD19正选试剂盒      | 18984                                                |
| EasySep™ Direct人总淋巴细胞分选试剂盒   | 19655                                                |
| 用于遗传学检测的细胞分选产品               |                                                      |
| EasySep™ Direct人B-CLL细胞分选试剂盒 | 19664                                                |
| EasySep™ 人CD138正选试剂盒II       | 17877                                                |
| RosetteSep™人多发性骨髓瘤细胞富集混合物    | 15129                                                |

1. SepMate™ (IVD) 在澳大利亚、加拿大、欧洲、英国和美国上市, 在这些国家, 它被注册为体外诊断 (IVD) 设备, 用于从人全血、脐带血和骨髓中通过密度梯度离心分离单个核细胞。该产品在中国也有销售, 中国食品药品监督管理局 (CFDA) 将其视为非医疗器械, 因此应作为一般实验室设备使用。
2. SepMate™ (RUO) 在SepMate™未注册为IVD设备且仅供研究使用 (RUO) 的地区可用。

## 细胞分选仪

| 产品          | 产品号 # |
|-------------|-------|
| RoboSep™-S  | 21000 |
| RoboSep™-16 | 23000 |

版权所有©2024 STEMCELL Technologies Inc. 保留所有权利, 包括图形和图像。STEMCELL Technologies & Design、STEMCELL Shield Design、Scientists Helping Scientific、EasySep、HetaSep、RoboSep、RosetteSep、SepMate、EasyEights、RapidSpheres、ImmunoCult、STEMvision和MethoCult是STEMCELL Technologies Canada Inc. 的商标。BloodStor、CryoStor和ThawSTAR是BioLife Solutions, Inc. 的注册商标。Nalgene是Sigma-Aldrich的注册商标。Lymphoprep是Serumwerk Bernburg AG的商标。以Lymphoprep品牌销售的产品也是由Serumwerk Bernburg AG生产的。Ficoll-Paque是GE HealthCare Ltd的注册商标。CoolCell、Corning和Falcon是Corning Incorporated的注册商标。所有其他商标均为其各自所有者的财产。尽管STEMCELL已尽一切合理努力确保STEMCELL及其供应商提供的信息正确无误, 但对此类信息的准确性或完整性不做任何保证或陈述。

除非另有说明, 产品仅供研究使用, 不适用于人或动物诊断或治疗用途。有关STEMCELL质量的更多信息, 请参阅[WWW.STEMCELL.COM/COMPLIANCE](http://WWW.STEMCELL.COM/COMPLIANCE)。