

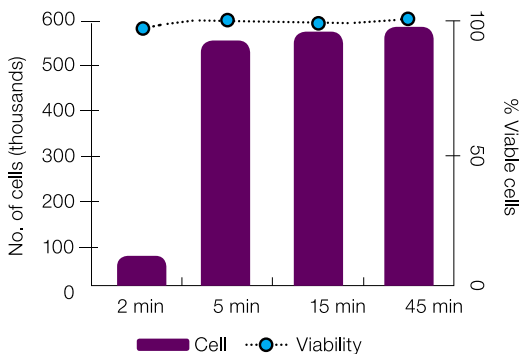


流式细胞制备方案

细胞制备 - 方案 A: 培养细胞

材料

- Accutase™ 含酶细胞解离液 (货号 00-4555) 或胰蛋白酶或乙二胺四乙酸 (EDTA)
- 流式细胞染色缓冲液 (货号 00-4222)
- 15 或 50mL 锥形离心管



Accutase™ 细胞解离液

在 DMEM+10% 胎牛血清 (FBS) 培养皿中培养的人 MG63 纤维肉瘤细胞被 Accutase 细胞分离液快速消化成活性很好的单细胞悬液。Accutase™ 解离液作用温和；细胞在 Accutase™ 解离液中 45 分钟后存活率高达 97±3%。

实验步骤

1. 对于悬浮生长的细胞，将其轻轻倒入锥形离心试管中，然后进行细胞计数和活性检测。前进至第 4 步。
2. 对于贴壁细胞，采用下列任意一种方法从培养皿上解离细胞：
 - 细胞刮刀
 - 胰蛋白酶
 - EDTA (10 mM 磷酸盐缓冲液)
 - Accutase™ 含酶细胞解离液
3. 将细胞倒入锥形离心试管中，并使用移液器吹散细胞，然后进行细胞计数和活性检测。
4. 细胞离心后并重悬于适当体积的流式细胞染色缓冲液，使最终浓度达到 10^7 个细胞 /mL (细胞终浓度可随不同实验要求而不同)。

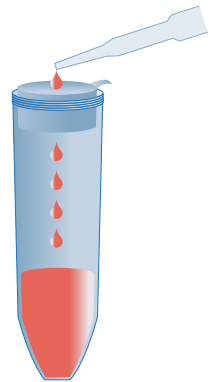
细胞制备 - 方案 B: 淋巴组织

通常机械性研磨淋巴组织可以让组织细胞变成单细胞悬液。

材料

- 60 × 15 mm 组织培养皿
- 3mL 注射器或毛玻璃玻片
- 细胞筛 (尼龙网)
- 流式细胞染色液 (货号 00-4222) 或其他缓冲液
- 15 或 50mL 锥形离心管

用移液器使细胞流过细胞筛



实验步骤

注：如果细胞要再培养，采用无菌操作和不含叠氮化物的缓冲液进行所有步骤。

1. 将组织 (脾、胸腺或淋巴结) 采集到含 10mL 流式细胞染色缓冲液或其他缓冲液的细胞培养皿中。用 3mL 注射器的活塞施压，制成单细胞悬液。或者在 10mL 流式细胞染色缓冲液中，利用毛玻璃玻片的两端将组织捣碎。
2. 将细胞筛放在 15 或 50mL 离心管的上方。从细胞培养皿中转移细胞至离心管，使细胞流过细胞筛，滤掉细胞团块和碎片。
3. 在 2-8°C 和 300-400 x g 的条件下，离心细胞悬液 4-5 分钟，弃上清。
4. 用适当体积的流式细胞染色缓冲液或其他缓冲液重悬细胞，并进行细胞计数和活性检测。
5. 按照第 3 步离心细胞并用适当体积的流式细胞染色液重悬细胞，使最终浓度达到 10^7 个细胞 /mL (细胞终浓度可随不同实验要求而不同)。

细胞制备 - 方案 C: 非淋巴组织

材料

- 手术剪或解剖刀片
- 磷酸盐缓冲液 (PBS) 或其他适当的生理缓冲液
- 组织消化酶
- 60 x 15 mm 细胞培养皿
- 3mL 注射器
- 细胞筛 (尼龙网)
- 流式细胞染色缓冲液 (货号 00-4222) 或选用其他缓冲液
- 15 或 50mL 锥形离心管

实验步骤

注: 如果细胞要再培养, 采用无菌操作和不含叠氮化物的缓冲液进行所有步骤。

1. 使用手术剪或解剖刀片将组织切成 2-4mm 小块。
2. 在 PBS 中添加适量的消化酶, 根据不同酶的建议使用量, 在适当的温度孵育一定时间。
3. 轻轻吹打细胞, 并使其流过细胞筛滤掉团块和碎片。将细胞悬液收集在离心管内。
4. 在 2-8°C 和 300-400 x g 的条件下, 离心细胞悬液 4-5 分钟。弃上清。
5. 用 PBS 重悬细胞
6. 重复第 4 步
7. 用适量流式细胞染色缓冲液重悬细胞团块, 并进行细胞计数和活性检测。
8. 按照第 4 步离心细胞并用适量的流式细胞染色液或其他缓冲液重悬, 使最终浓度达到 10^7 个细胞 /mL (细胞终浓度可随不同实验要求而不同)。

细胞制备 - 方案 D: 从全血中分离 PBMC

材料

- PBS
- Ficoll™ Paque 或其他密度梯度分离液
- 流式细胞染色缓冲液 (货号 00-4222) 或选用其他缓冲液
- 15 或 50mL 锥形离心管

Ficoll离心之前的分层



Ficoll离心之后的分层



实验步骤

注: 如果细胞要再培养, 采用无菌操作和不含叠氮化物的缓冲液进行所有步骤。

1. 在离心管中用 PBS 将全血进行至少 1:1 倍稀释。
2. 在离心管的底部加入与稀释前全血样本相同体积的 Ficoll, 在 Ficoll 的上层缓缓加入稀释后的全血。
3. 400xg 室温离心 20 分钟 (离心过程中务必使“Brake”按键处于关闭状态)。
4. 采集 PBS 和 Ficoll 层交界处的外周血单核细胞 (PBMC) 到新试管内。
5. 在试管内加入适量 PBS, 洗涤细胞。
6. 在 2-8°C 和 300-400 x g 的条件下, 离心细胞 4-5 分钟, 弃上清。
7. 使用适当体积流式细胞染色缓冲液或其他缓冲溶液重悬细胞, 并进行细胞计数和活性检测。
8. 按照第 6 步离心细胞并重悬于流式细胞染色缓冲液或其他缓冲液中, 使最终浓度达到 10^7 个细胞 /mL (细胞终浓度可随不同实验要求而不同)。



赛默飞
官方微信



赛默飞
生命科学官方微信

免费服务电话: 800 820 8982/400 820 8982

信息咨询邮箱: LifeScience-CNTS@thermofisher.com

ThermoFisher
SCIENTIFIC