

Leukopak密度梯度离心操作说明书

为了获得最佳分离效果和良好的初始样本，建议您在分离PBMC之前准备好Leukopak及相关材料，该说明书仅供参考。

● 试剂耗材

Leukopak、密度梯度试剂、Wash Buffer（500ml不含钙或镁离子的PBS (DPBS)、0.5%人血清白蛋白(HSA)、2mM EDTA）、75%乙醇、3mL巴氏吸管、10mL移液管、50mL无菌离心管、大型无菌容器（用于盛放Leukopak）

● 设备

生物安全柜（BSC）、微量移液器、离心机

● 实验方法

1. 先将EDTA与HSA混入DPBS中，混匀配制成Wash Buffer。
2. 拍照记录Leukopak的状态，用75%的酒精溶液喷洒外包装后，放入生物安全柜（BSC）。
3. 请在Leukopak开封前先将样本混匀，并倒入有刻度的容器中，测量液体体积。**混匀后取部分Leukopak进行计数。**
4. 用DPBS将Leukopak按照一定比例进行稀释（根据不同分离试剂选择，建议范围：DPBS：Leukopak=1：1~3）。
5. 用无菌的移液管将20mL密度梯度试剂加到50ml离心管中（不要碰到管壁上部），再将步骤4中已稀释的Leukopak按照30mL/管加入离心管中（加入Leukopak的过程一定要轻柔，

妙顺（上海）生物科技有限公司

地址：中国 | 上海 | 浦东新区盛夏路169号A栋711室 | 邮箱：techserv@miles-bio.com

电话：86-21-64169736 网站：www.miles-bio.com

不可冲破密度梯度试剂的界面，否则会严重影响后续PBMC的得率)。

6. 离心步骤：在18-22°C的条件下将步骤5中的试剂进行离心，离心条件400 g、30 min，（注意：为保证分离效果，需将离心机升降速率调至最低，即升速为1，降速为0）。
7. 离心完成后，请用75%的酒精将50ml离心管进行消毒再转移回BSC。离心后，离心管内试剂肉眼可见分为三层，上层为血浆与DPBS，下层主要为红细胞与粒细胞，中层为淋巴细胞分离液。在上、中层界面处有一以单个核细胞为主的白膜层（单个核细胞包括淋巴细胞和单核细胞。此外，还含有血小板）。
8. 取白膜层：移液管吸弃上层液体（不可倾倒），余下少部分（不可除净）用巴氏吸管取密度梯度层顶部的白膜层（PBMC）放入带有标记的无菌50mL离心管中。
9. 去除血小板：将装有收集的PBMC的离心管中加入**足量**的DPBS，在18-22°C下，550g（升5降4）离心15 min，弃去上清液。
10. 洗涤（可选）：用Wash Buffer洗涤细胞两次，每次400 g离心10 min。
11. 根据后续实验选择合适的Medium将细胞沉淀重悬并混匀，计数后，进行后续实验。

● 注意事项

1. 75%乙醇是对表面进行抗菌处理的**最佳有效浓度**。
2. 操作过程中严格进行无菌操作，并建议实验人员穿实验服，戴手套，护目镜和口罩。
3. 使用动物源的生物材料和液氮时，请始终穿戴个人防护设备并采取通用预防措施。
4. 吸取单个核细胞时不可避免会吸到Ficoll，而Ficoll密度比细胞要大，因此步骤9中需加入足量PBS稀释，若PBS体积太小可能会导致细胞无法离心收集。

妙顺（上海）生物科技有限公司

地址：中国 | 上海 | 浦东新区盛夏路169号A栋711室 | 邮箱：techserv@miles-bio.com

电话：86-21-64169736 网站：www.miles-bio.com