

产品使用说明书

Leecoll 密度梯度离心介质

货号：LCS01, LCS02

产品参数

物理状态	液体
成分	聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) 涂层改性的硅胶颗粒介质
CAS	65455-52-9
密度 (20°C, g/mL)	1.125-1.135
粘度 (cP)	<15;
渗透压 (mOsmol/kg)	<25
电导率 (mS/m)	<100
pH 值	8.5-9.5
颜色	无色至微黄色

产品描述

Leecoll 是一款经充分验证的细胞、病毒及亚细胞颗粒密度梯度离心介质。

本产品依托成熟的密度梯度离心原理，能够在 1.0~1.3g/mL 密度区间内，温和、快速、高效地完成多种细胞类型、病毒及亚细胞组分的分离工作，适配绝大多数沉降系数大于 60S 的生物颗粒分离场景。

产品核心成分为聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) 涂层改性的硅胶颗粒介质，颗粒直径为 15~30nm，游离 PVP 含量仅 1%~2%，配方科学稳定。本产品硅胶颗粒存在天然粒径异质性，离心过程中可实现差异化速率沉降，自发形成连续、等渗的密度梯度。实验操作便捷灵活，可通过梯度混合器或高速离心机快速构建密度梯度；也可将样品与介质提前预混，在原位形成的梯度中完成分离，实现梯度构建与样品分离一步完成，单次操作即可达成分离效果，大幅简化实验流程、提升实验效率。

产品用途

适用于血液、组织等生物样本处理，可高效完成细胞、细菌、病毒、细胞器及各类亚细胞组分的分离、纯化与富集，还可有效分离完整活细胞与受损细胞及细胞碎片。

- 各种动物的全血免疫细胞分离
- 原代肝实质细胞提取
- 原代肝非实质细胞提取
- 原代骨髓中性粒细胞分离
- 原代肠道上皮/内皮免疫细胞分离
- 病毒、线粒体、各种细胞器的分离

产品运输与储存

- 常温运输
- 产品可在 4-30°C 环境下存放，4-8°C 冷藏为更优选的储存环境。
- 未开封产品常温条件下有效期可达 5 年；开封后建议置于 4-8°C 冷藏保存；推荐本品无论是否启封，均统一在 4-8°C 条件下储存。
- 不适合长期放置于 -20°C 冷冻环境；若短期 -20°C 保存，存放时长不宜超过半年，产品冻融后需充分混匀方可继续使用。
- 储存期间维持体系 pH 值在 5.5-10 范围内，同时避免试剂与二价阳离子发生接触。

使用方法

1. 制备密度梯度介质

本产品依托密度梯度离心原理开展样本分离，利用不同细胞及颗粒在差异化密度体系中沉降速率的差异实现组分分离，因此工作液密度精度是保障分离效果的核心关键。在精准把控溶液密度的前提下，还需维持适宜的渗透压，以此保护待分离样本的结构与活性。

1.1 一步法稀释（直接配制目标工作液）：

(1) 请根据目标分离组分选择目标工作液密度和体积，然后按照以下公式计算出配制目标工作液所需的 Leecoll 细胞分离液、稀释液和蒸馏水体积。

$$V_0 = V \times (\rho - 0.1\rho_{10} - 0.9) / (\rho_0 - 1)$$

V_0 = 未稀释 Leecoll 细胞分离液的体积 (mL)；

V = 目标工作液总体积 (mL)；

ρ = 目标工作液密度 (g/mL)；

ρ_0 = 未稀释 Leecoll 细胞分离液的密度 (1.130 g/mL)；

ρ_{10} = 稀释液的密度 (1.5 M NaCl 溶液的密度约为 1.058 g/mL；2.5 M 蔗糖溶液的密度约为 1.316 g/mL)

(2) 根据以上公式计算出 V_0 后，量取 $V/10$ 的稀释液（1.5 M NaCl 溶液或 2.5 M 蔗糖溶液），将 Leecoll 细胞分离液和稀释液充分混匀，最后用蒸馏水补足至 V 即可。

1.2 两步法稀释（先配制等渗溶液，再稀释至目标工作液）：

(1) 等渗溶液的配制：对于细胞样品，将 Leecoll 细胞分离液与 1.5 M NaCl 溶液或 10×PBS 按照体积比 9:1 的比例进行混合配制。对于亚细胞颗粒或病毒样品，将 Leecoll 细胞分离液与 2.5 M 蔗糖溶液按照体积比 9:1 的比例进行混合配制。

(2) 请根据目标分离组分选择目标工作液密度和体积，然后按照以下公式计算出配制目标工作液所需的等渗溶液和稀释液的体积。细胞样本选用 0.15 M NaCl 溶液或 1×PBS 稀释等渗溶液至所需密度；亚细胞颗粒或病毒样本则选用 0.25 M 蔗糖溶液稀释等渗溶液至所需密度。

$$\rho_3 = (9 \times \rho_0 + 1 \times \rho_{10}) / 10$$

$$V_3 = V \times (\rho - \rho_2) / (\rho_3 - \rho_2)$$

$$V_2 = V - V_3$$

ρ_3 = 等渗溶液密度 (g/mL)；

ρ_0 = 未稀释 Leecoll 细胞分离液的密度 (1.130 g/mL)；

ρ = 目标工作液密度 (g/mL)；

ρ_{10} = 等渗溶液稀释液密度 (1.5 M NaCl 溶液的密度约为 1.058 g/mL；2.5 M 蔗糖溶液的密度约为 1.316 g/mL)；

ρ_2 = 目标工作液稀释液密度 (0.15 M NaCl 溶液和 0.25 M 蔗糖溶液的密度约为 1.00 g/mL)；

V_3 = 等渗溶液体积 (mL)；

V = 目标工作液体积 (mL)；

V_2 = 目标工作液稀释液体积 (mL)

(3) 依据上述公式算出 V_3 和 V_2 ，再分别量取等渗溶液与稀释液，混匀后得到目标工作液。

1.3 预制密度梯度：

从下至上按照从高密度到低密度逐层放置的先后顺序，用吸头或注射器，紧贴管壁，使液体自然缓慢流下，确保上层溶液（低密度）不会溅入下层（高密度）或者混入分界处，形成梯度。

2. 密度梯度离心

密度梯度离心可结合实验需求，选用对应的离心方式。

2.1 角转子高速离心（自生成梯度模式）

以 0.15 M 生理盐水配制的 Leecoll 细胞分离液，在约 10000×g 条件下离心 15 min；

以 0.25 M 蔗糖溶液配制时，则采用 25000×g 离心 15 min，离心过程中分离液会从管底到液面自发构建出连续密度梯度。

该操作模式下，样品可在离心前直接与 Leecoll 细胞分离液充分混匀。离心期间，样本颗粒会依托自发形成的梯度，按照自身浮力密度差异完成分层，最终富集在和自身密度匹配的位置，形成界限清晰的等密度条带。该方案适合亚细胞组分、病毒样品的高效率分离制备。

2.2 水平转子低速离心（预制梯度模式）

针对活细胞等对剪切损伤敏感的样品，优先选用水平转子开展低速离心（示例离心力 400 g）。

该方式需要提前配制连续或非连续的预制密度梯度（详见 1.3 操作步骤），使用吸头或注射器将样品轻柔铺加在分离液上层。离心程序需选用缓慢的升降速参数（例如升降速档位设置为 0 或 1，离心时长 20–30 min）。

该离心方式能够很好地保护梯度体系不被破坏，防止已经分离开的细胞条带受流体扰动再次混匀，保证细胞在温和的离心环境下迁移至等密度界面，最终得到活性与回收率更优的细胞产物。

3. 获取目标组分

密度梯度离心完成后，体系将形成范围约 1.0–1.3 g/mL 的连续密度梯度。不同类型的细胞或颗粒，会依据自身浮力密度（Buoyant density）上浮或下沉，最终富集于与其密度匹配的等密度条带。轻柔吸取目标分层区带，即可收集得到目的组分。

下表汇总了各类细胞与亚细胞组分在 Leecoll 细胞分离液中的参考浮力密度及分布位置；该数据仅作为实验参考依据，不同来源、不同物种的样本实际分布会存在一定偏差。

样品类型	浮力密度 (g/mL)	分离后位置	备注
细胞	血小板 (Platelet)	<1.04	上层或漂浮液体表面
	淋巴细胞 (Lymphocyte)	1.055–1.065	中层，界面
	单核细胞 (Monocyte)	1.060–1.068	中下层
	嗜中性粒细胞 (Neutrophil)	1.080–1.090	下层
	红细胞 (Erythrocyte)	>1.09	底部沉淀层
亚细胞组分	细胞质 (Cytoplasm)	<1.05	上层或漂浮
	微粒体 (Microsome)	1.09–1.12	中层
	溶酶体 (Lysosome)	1.12–1.15	中下层
	线粒体 (Mitochondria)	1.17–1.20	下层
	细胞核 (Nucleus)	>1.20	最底部

4. 清洗步骤

由于 Leecoll 细胞分离液无细胞毒性，且不会附着于细胞膜表面，一般情况下无需额外洗脱处理。分离所得细胞可直接转入培养体系，病毒样本可直接开展感染实验，细胞器样本也能够直接用于后续功能学分析。

若实验要求去除分离液介质，可采用下述洗涤方案：

(1)细胞样本:加入预冷的 5 倍体积生理盐水或 PBS 轻柔重悬洗涤;于 4℃、200–400×g 条件下离心 2–10 min，去除上清液。必要时可重复洗涤 2–3 次，收集细胞沉淀。

(2)亚细胞组分样本:加入预冷的 5 倍体积生理盐水或 PBS 轻柔混匀洗涤;于 4℃、10000–20000×g 离心 10–30min，缓慢弃去上清，收集沉淀组分。

注:实际选用的离心力需根据目标亚细胞颗粒的类型进行调整。

(3)病毒、外泌体及其他微小颗粒样本:取原液不进行稀释，采用水平转子在 4℃、100000×g 离心 120min; 若使用角转子则离心 90min，沉淀分离液介质后收集上清，获得目标颗粒。

实验方案

以下为产品通过内部测试的详分离及流式检测实验方案，实验条件可供参考。

若无开展流式检测，收集得到目标细胞层后，直接重悬至适配的培养基中培养即可。

A. 小鼠全血免疫细胞分离及鉴定

试剂

- 1) Leecoll 细胞分离液 (Leecoll)
- 2) 10× PBS 溶液 (不含钙、镁离子)
- 3) 1× PBS 溶液 (不含钙、镁离子)
- 4) D-Hank's 溶液 (不含钙、镁离子)
- 5) 乙二胺四乙酸 (EDTA)
- 6) 纯水
- 7) 牛血清白蛋白 (BSA)
- 8) 流式抗体 (Anti-CD4、Anti-CD3、Anti-CD19、Anti-CD4、Anti-CD8a、Anti-CD11b、Anti-Ly6G)

溶液配置

- 1) 0.1% EDTA 抗凝液: 称取 20 mg EDTA 固体, 加 20 mL 纯水溶解得
- 2) 2% BSA D-Hank's 溶液: 称取 1 g BSA 固体, 加 50 mL D-Hank's 溶解得
- 3) 60% 等渗工作液配置

名称	体积 (共 3 mL)
Leecoll 细胞分离液	1.62 mL
10× PBS	0.18 mL
1× PBS	1.2 mL

实验操作

- 1) 取 1 只 C57BL/6J 小鼠全血 (0.1% EDTA 抗凝), 加等体积 D-Hank's 稀释, 之后进行密度梯度分离测试
- 2) 于 15 mL 离心管内配置 3 mL 60%等渗工作液, 倾斜离心管, 于液面上层约 1 cm 处, 沿壁缓慢加入约 1 mL 稀释后全血
- 3) 室温, 200 g 离心 10 分钟 (升速、降速都为 1)
- 4) 可在工作液和血浆层间观察到细胞白膜层 (即含全血免疫细胞层)
- 5) 用 1 mL 移液枪自上而下, 先吸走最上层大部分血浆后, 再取白膜层 (约 1 mL), 转移至新 15 mL 离心管内
- 6) 加 5 mL 含 2% BSA 的 D-Hank's 离心洗涤 2 次, 每次 4°C, 400 g 离心 5 分钟 (无升、降速要求, 可为 8)
- 7) 用 100 μL 含 2% BSA 的 D-hank's 重悬细胞, 并转移至 1.5 mL EP 管内, 置于冰上
- 8) 利用流式抗体进行免疫荧光染色, 冰上抗体孵育 20 分钟后, 400 g 离心 5 分钟 (无升、降速要求, 可为 8), 去上清, 加 200 μL 含 2% BSA 的 D-Hank's 重悬细胞
- 9) 流式检测

B. 小鼠肝实质细胞分离及鉴定

试剂

- 1) 10XPBS 溶液(不含钙、镁离子)
- 2) 1XPBS 溶液(不含钙、镁离子)
- 3) D-Hank's 溶液(不含钙、镁离子)
- 4) 乙二醇双(2-氨基乙基醚)四乙酸(EGTA)
- 5) 胶原酶 IV
- 6) CaCl₂
- 7) 阿佛丁
- 8) 牛血清白蛋白(BSA)
- 9) Williams-E 基础培养基
- 10) 胎牛血清(FBS)
- 11) 100X 青霉素/链霉素溶液, 灭菌
- 12) Leecoll 细胞分离液(Leecoll)

溶液配置

- 0.5 mM EGTA D-Hank's 溶液:称取 9.51 mg EGTA,加 50 mL D-Hank's 溶解, 0.22 μ m 滤膜过滤除菌, 置于 37°C 恒温水浴锅中预热-
- 0.5 mg/mL 胶原酶 IV 消化液:称取 25 mg 胶原酶 IV、55.5 mg CaCl_2 ,加 50 mL D-Hank's 溶解, 0.22 μ m 滤膜过滤除菌, 置于 37°C 恒温水浴锅中预热
- 2% BSA D-Hank's 溶液:称取 1 g BSA 固体, 加 50 mL D-Hank's 溶解, 即得。
- Williams-E 完全培养基:取 5 mL FBS、0.5 mL 100X 青霉素/链霉素溶液, 加至 45 mL Williams-E 基础培养基中混匀即可
- 70%等渗工作液配置

名称	体积 (共 5 mL)
Leecoll 细胞分离液	3.15 mL
10 $\times$ PBS	0.35 mL
D-Hank's	1.5 mL

实验操作

- 取 1 只小鼠, 腹腔注射阿佛丁麻醉 (小鼠按 30 μ L/g 计算, 大鼠按 25 mL/kg 计算), 固定小鼠四肢, 打开腹腔, 内容物拨到一侧, 暴露出门静脉和下腔静脉, 切忌不可损伤任何脏器, 以免污染;
- 利用静脉留置针 (24G) 斜向插入下腔静脉, 之后注射器压入少量 0.5 mM EGTA 溶液, 再剪开门静脉, 让灌流液流出, 接着再按 6 mL/分钟左右的流速, 缓慢压入 0.5 mM EGTA 溶液, 共灌注约 30 mL 体积;
- 换 胶原酶 IV 消化液进行灌注, 同样是 6 mL/分钟左右流速, 共灌注约 30 mL 体积;
- 观察肝脏肿胀、包膜紧张状态、按压凹陷是否回弹
- 完整剪下肝脏, 放入预冷 D-Hank's 的无菌大皿, 剔除胆囊, 在超净台内, 用镊子轻轻撕开肝包膜, 轻柔摇晃, 用无菌巴氏滴管轻柔吹打, 使肝细胞释放到 D-Hank's 中
- 细胞悬液过 70 μ m 细胞筛, 去除组织碎片, 4°C, 80 g 离心 5 分钟 (无升、降速要求, 可为 8)
- 25 mL D-hank's 重悬沉淀细胞, 再用移液管量取 5 mL 细胞悬液, 转移至含 5 mL 70%等渗工作液的 15 mL 离心管内, 并轻柔吹打混匀
- 4°C, 600 g 离心 10 分钟 (升速、降速都为 1)
- 离心结束后, 死细胞在最上层, 活细胞在离心管底, 弃去沉淀上层液体后, 加入 5 mL 含 2% BSA 的 D-hank's 离心洗涤 2 次, 每次 4°C, 80 g 离心 5 分钟 (无升、降速要求, 可为 8)
- 加入 Williams-E 完全培养基, 计数后铺于 6 孔板内、置于 37 度细胞培养箱内培养
- 次日, 拍照观察细胞贴壁情况

C. 小鼠肝非实质细胞分离及鉴定

试剂

- Leecoll 细胞分离液 (Leecoll)
- 10 $\times$ PBS 溶液 (不含钙、镁离子)
- 1 $\times$ PBS 溶液 (不含钙、镁离子)
- D-Hank's 溶液 (不含钙、镁离子)
- 乙二醇双 (2-氨基乙基醚) 四乙酸 (EGTA)
- 胶原酶 IV
- DNA 酶 I
- CaCl_2
- 牛血清白蛋白 (BSA)
- DMEM 基础培养基
- 胎牛血清 (FBS)
- 100 $\times$ 青霉素/链霉素溶液, 灭菌

溶液配置

- 1) 0.5 mM EGTA D-Hank's 溶液: 称取 9.51 mg EGTA, 加 50 mL D-Hank's 溶解, 0.22 μ m 滤膜过滤除菌, 置于 37°C 恒温水浴锅中预热
- 2) 0.5 mg/mL 胶原酶 IV 消化液: 称取 25 mg 胶原酶 IV、15 mg DNA 酶、55.5 mg CaCl_2 , 加 50 mL D-Hank's 溶解, 0.22 μ m 滤膜过滤除菌, 置于 37°C 恒温水浴锅中预热
- 3) 2% BSA D-Hank's 溶液: 称取 1 g BSA 固体, 加 50 mL D-Hank's 溶解, 即得。
- 4) DMEM 完全培养基: 取 5 mL FBS、0.5 mL 100X 青霉素/链霉素溶液, 加至 45 mL DMEM 基础培养基中混匀即得
- 5) 100% 等渗工作液:

名称	100% 等渗工作液
Leecoll 细胞分离液	2.7 mL
10 $\times$ PBS	0.3 mL

- 6) 33% & 66% 等渗工作液配置

名称	33% 等渗工作液	66% 等渗工作液
100% 等渗工作液	0.66 mL	1.32 mL
1 $\times$ PBS	1.34 mL	0.68 mL

实验操作

- 1) 安乐死小鼠, 取完整肝组织, 放入预冷 D-Hank's 的无菌大皿, 剔除胆囊, 在超净台内, 用剪刀将肝组织剪碎
- 2) 加入 20 mL 0.5 mM EGTA 的 D-Hank's 溶液, 置于 37°C 摇床上 100 rpm 振荡洗涤 10 分钟, 过 70 μ m 细胞滤膜, 取上层组织转移至新离心管内
- 3) 再加入 20 mL D-Hank's 重悬细胞, 过 70 μ m 细胞滤膜, 洗去残留 EGTA, 取上层组织转移至新离心管内
- 4) 加入 30 mL 胶原酶 IV 消化液, 置于 37°C 摇床上 100 rpm 振荡消化 30 分钟;
- 5) 4°C, 80 g 离心 5 分钟 (无升、降速要求, 可为 8), 弃下层细胞, 取上清;
- 6) 4°C, 650g 离心 5 分钟 (无升、降速要求, 可为 8), 弃上清, 沉淀为粗肝非实质细胞, 加 2 mL D-Hank's 进行重悬;
- 7) 取 15 mL 离心管, 先加入 2 mL 66% 等渗工作液
- 8) 之后倾斜离心管, 于液面上层约 1 cm 处, 沿壁缓慢加入 2 mL 33% 等渗工作液
- 9) 最后, 再按同样的操作, 沿侧壁向液面最上层加入约 1 mL 的细胞悬液
- 10) 4°C, 1060 g 离心 10 分钟 (升速、降速都为 1)
- 11) 离心结束后, 死细胞在最上层, 活细胞在 33%/66% 密度层中间, 为一层白膜
- 12) 用 1 mL 移液枪自上而下, 先吸走白膜上层液体, 再取白膜层, 约 1 mL, 转移至新 15 mL 离心管内
- 13) 加 5 mL 含 2% BSA 的 D-Hank's 离心洗涤 2 次, 每次 4°C, 650 g 离心 5 分钟 (无升、降速要求, 可为 8)
- 14) 最后, 加入 10% FBS 的 DMEM 培养基, 于 12 孔板内、置于 37 度细胞培养箱内培养
- 15) 次日, 拍照观察细胞贴壁情况

D. 小鼠小肠上皮免疫细胞分离及鉴定

试剂

- 1) 10 $\times$ PBS 溶液 (不含钙、镁离子)
- 2) Leecoll 细胞分离液 (Leecoll)
- 3) D-Hank's 溶液 (不含钙、镁离子)
- 4) 乙二胺四乙酸 (EDTA)
- 5) 二硫苏糖醇 (DTT)
- 6) RPMI 1640 基础培养基
- 7) 牛血清白蛋白 (BSA)
- 8) 流式抗体 (Anti-CD45、Anti-CD3、Anti-CD4、Anti-CD8a)

溶液配置

- 1) 2 mM DTT 和 5 mM EDTA 细胞提取液: 称取 15.43 mg DTT、0.5 M EDTA 母液 0.5 ml, 加 50 mL D-Hank's 溶解, 置于 37°C 恒温水浴锅中预热

- 2) 2% BSA D-Hank's 溶液: 称取 1 g BSA 固体, 加 50 mL D-Hank's 溶解, 4°C 储存
- 3) 40% 等渗工作液配置

名称	体积 (4 mL)
Leecoll 细胞分离液	1.44 mL
10× PBS	0.16 mL
RPMI 1640 基础培养基	2.4 mL

实验操作

- 1) 安乐死小鼠, 取出小肠 (幽门-盲肠), 冰上操作, 剥离全部肠系膜脂肪
- 2) 预冷 D-Hank's 注射器冲洗肠腔, 冲净粪便黏液, 纵向剪开肠管, 剪成 0.5-1 cm 碎片
- 3) 肠碎片转移至 50 mL 管, 加入 15 mL 预热至 37 °C 的细胞提取液
- 4) 37 °C 摇床, 250 rpm 振荡 2×20 min; 两次振荡, 分别过 70 μm 细胞筛, 收集上清
- 5) 合并上清, 4°C, 400 g 离心 5 分钟 (无升、降速要求, 可为 8), 弃上清
- 6) 加入 4 mL 的 40% 等渗工作液, 吹打混匀细胞, 转移至 15 mL 离心管内
- 7) 之后, 4°C, 600 g 离心 10 分钟 (升速、降速都为 1)
- 8) 离心结束后, 脂肪细胞在最上层, 免疫细胞在离心管底, 弃去沉淀上层液体后, 加入 5 mL 含 2% BSA 的 D-Hank's 离心洗涤 2 次, 每次 4°C, 400 g 离心 5 分钟 (无升、降速要求, 可为 8)
- 9) 之后, 用 100 μL 含 2% BSA 的 D-Hank's 重悬细胞, 并转移至 1.5 mL 的 EP 管内, 置于冰上
- 10) 利用流式抗体进行免疫荧光染色, 冰上抗体孵育 20 分钟后, 4°C, 400 g 离心 5 分钟 (无升、降速要求, 可为 8), 去上清, 加 200 μL 含 2% BSA 的 D-Hank's 重悬细胞
- 11) 流式检测

E. 小鼠骨髓中性粒细胞分离及鉴定

试剂

- 1) Leecoll 细胞分离液 (Leecoll)
- 2) 10× PBS 溶液 (不含钙、镁离子)
- 3) 1× PBS 溶液 (不含钙、镁离子)
- 4) D-Hank's 溶液 (不含钙、镁离子)
- 5) 柠檬酸钠
- 6) 牛血清白蛋白 (BSA)
- 7) 流式抗体 (Anti-CD45、Anti-CD11b、Anti-Ly6)

溶液配置

- 1) 0.38% 柠檬酸钠 D-Hank's 溶液: 称取 190 mg 柠檬酸钠固体, 加 50 mL D-Hank's 溶解, 0.22 μm 滤膜过滤除菌, 4°C 保存
- 2) 2% BSA D-Hank's 溶液: 称取 1 g BSA 固体, 加 50 mL D-Hank's 溶解, 4°C 保存
- 3) 100% 等渗工作液配置

名称	100% 等渗工作液
Leecoll 细胞分离液	8.1 mL
10× PBS	0.9 mL

- 4) 52% & 64% & 72% 等渗工作液配置

名称	52% 等渗工作液	64% 等渗工作液	72% 等渗工作液
100% 等渗工作液	1.56 mL	1.92 mL	2.16 mL
1× PBS	1.44 mL	1.08 mL	0.78 mL

实验操作

- 1) 安乐死小鼠, 取出双下肢股骨、胫骨

- 2) 剪开后，用预冷 0.38% 柠檬酸钠 D-Hank's 吹出红骨髓，轻轻吹打分解骨髓，以产生单细胞溶液
- 3) 4°C，230 g 离心 6 分钟（无升、降速要求，可为 8）获得细胞沉淀后，加入 5 mL 0.38% 柠檬酸钠 D-Hank's 重悬并洗涤细胞，离心条件同前
- 4) 加 2 mL D-Hank's 重悬细胞待用
- 5) 利用注射器和 20 cm 长针头，伸到离心管底部，按 52%、64%、72% 的顺序，依次向离心管底加入等渗工作液，加液操作要慢，最后形成自上而下为 52%、64%、72% 的梯度密度层，各密度层分界线需肉眼可见，很重要！
- 6) 用 1 mL 移液枪向最上层液面缓慢加入 2 mL 细胞悬液
- 7) 4°C，1060 g 离心 10 分钟（升速、降速都为 1）
- 8) 离心结束后，会肉眼可见 4 层细胞，自上而下，分别为死细胞层、淋巴细胞和单核细胞及部分未成熟中性粒细胞层、中性粒细胞层、红细胞层（离心管底）
- 9) 用 1 mL 移液枪，自上而下，吸取第三层细胞白膜层，约 1 mL，转移至新 15 mL 离心管内，
- 10) 加 5 mL 含 2% BSA 的 D-Hank's 离心洗涤 2 次，每次 4°C，400 g 离心 5 分钟（无升、降速要求，可为 8）
- 11) 用 100 μ L 含 2% BSA 的 D-Hank's 重悬细胞，并转移至 1.5 mL 的 EP 管内，置于冰上
- 12) 利用流式抗体进行免疫荧光染色，冰上抗体孵育 20 分钟后，4°C，400 g 离心 5 分钟（无升、降速要求，可为 8），去上清，加 200 μ L 含 2% BSA 的 D-Hank's 重悬细胞
- 13) 流式检测

注意事项

1. 为了确保操作人员的安全与健康，实验全过程请务必穿戴实验服并佩戴一次性手套。
2. 本品所附带的部分产品技术信息仅供客户参考、学术交流与科学研究之用；我司不对所提供信息的绝对权威性与完整性作担保。
3. 本品仅供科学研究使用，严禁用于临床诊断、治疗、食品及药品等任何人体相关用途，禁止存放于普通住宅。
4. 本品方法开发与性能验证过程中的动物操作均严格遵循实验动物伦理相关规范完成。使用者开展动物实验时，须遵守所属机构的实验动物伦理审查要求与动物福利管理规定。
5. 本产品离心后易在离心管底、管壁残留二氧化硅沉淀，干燥后难以清洗，实验结束后需立即水洗设备；优先选用聚碳酸酯（PC）材质离心管。
6. 本产品在 pH 5.5-10.0 区间内性能稳定；pH<5.5、含 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等二价阳离子或高温环境，均会诱发胶体二氧化硅胶凝失稳，实验需规避低 pH、高盐及含二价离子体系。
7. 所有硅胶胶体在长期储存时形成聚集体是一种固有趋势。这些聚集体可能在某些批次的产品中观察到，表现为管底的轻微沉淀物或密度为 1.04 至 1.05 g/mL 的淡白色条带。该条带可能在离心机形成梯度时或预形成梯度的低速离心过程中形成。聚集的硅胶不会干扰生物颗粒的分离，且几乎所有细胞和细胞器在分离液中的浮力密度均大于 1.05 g/mL。对于大多数细胞、病毒和细胞器的分离，从梯度材料中带出的任何二氧化硅胶聚集体均可忽略不计。
8. 本产品为无菌包装，请注意无菌操作，防止污染。如果有额外的灭菌需求，仅可对 Leecoll 细胞分离液原液进行 121°C、30 分钟高压灭菌（因为含盐、蔗糖体系易引发产品胶凝或焦糖化），不可采用 0.22 μ m 过滤除菌。灭菌过程中需减少产品与空气接触，防止气液界面生成固体颗粒，建议使用窄口瓶封装；若产生颗粒，可通过 0.45 μ m 过滤或 500 g 低速离心 5 分钟去除。灭菌后若出现液体体积损耗，可补充对应体积蒸馏水，不会改变产品密度。

技术问答

可能出现的问题及解决方案：

技术问题	可能原因	解决方案
离心后，目标细胞偏少、甚至无目标细胞	细胞样本在环境中放置太久，导致目标细胞死亡、减少；	细胞样本离体后，应尽快完成密度梯度分离；
	本来目标细胞就少，比如血液中的 NK 细胞、肝中的非实质细胞	合并多份待分离样品，提高目标细胞数量；比如血液样本中的 NK 细胞分离，可先完成全血免疫细胞分离，再合并多份样本进行 NK 细胞分离
	梯度密度工作液配置不正确，无法实现目标细胞分离	复盘工作液配置流程，看是否有错误操作；查阅文献，再次评估所用梯度是否为文献报道常用方案；不同种属来源的细胞，其占比和密度是有很大差异的，需仔细核对所配梯度密度工作液是否适配当前细胞的分离
	提取操作不正确，使目标细胞丢失	查阅文献、改进目标细胞提取手法
	离心力太大或离心时间过长，导致目标细胞被离心至管底与杂细胞混合	降低离心力和减速离心时间
血液样本，离心后，发现红细胞挂壁	血液样本量偏多，导致分离不完全	全血细胞分离，建议是 3ml Leecoll 工作液对应 1ml 血液样本稀释液
	离心力不够，或离心时间不够	提高离心力和增加离心时间
离心后，细胞层不集中	在向离心管内加入梯度密度工作液或细胞悬液时，加入速度过快，导致密度层间溶液发生混匀，密度层变宽	改进加样手法，60 度左右倾斜离心管，在前一分离液层上方约 1cm 处，沿着管壁加入工作液或细胞悬液；当密度层较多时，可借助注射器和 20cm 以上长针头，伸至离心管底，按密度由低到高顺序，向离心管底添加工作液，最后，在分离液上方加入待分离样本
离心后，细胞层有细胞结团	样本的抗凝操作没做好，导致细胞溶血；例如，小鼠骨髓中性粒细胞提取时，若在用注射器从骨髓中灌注细胞时，所使用的灌注液中未添加柠檬酸钠，则会引起溶血情况，细胞聚集，导致分离后细胞成团	提取小鼠骨髓中性粒细胞时，使用含 0.38% 柠檬酸钠的 Hank's 进行灌注
全血细胞分离时，出现成片的纤维挂壁情况	血液样本抗凝操作没做好，导致部分凝血	从动物体内采血时间尽量短，取血过程中，不定时颠倒采血管，使抗凝剂与血液充分混合
Leecoll 细胞分离液凝胶化	pH < 5.5/二价阳离子存在/高温	保持 pH 5.5-10.0；避免 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} ；控制温度
分离液有水分析出	常温保存时间过长导致水分析出	建议长期保存于 2-8 °C 条件下
高压灭菌后性状改变/失效	灭菌时混入了盐/蔗糖/二价阳离子	仅对未添加盐/蔗糖/二价阳离子的 Leecoll 细胞分离液原液灭菌