

细胞分选技术 百科全书



目录

概述	3
细胞分选方法	4
从血液分选细胞	10
制备组织样本	14
细胞分选结果的评估	15
关于磁珠细胞分选的常见问题	18
实验流程和技术窍门	23
常规实验流程	23
血液处理实验流程	27
组织处理实验流程	31
热门产品	35
参考文献	36

概述

细胞生物学并不简单，为了获得有意义的结果研究人员通常会对多个变量进行分析。比起异质细胞群，使用单一的细胞群进行实验，是降低实验复杂性的常用方法。这使得细胞生物学家能够准确地将观察到的结果归因于特定的细胞类型。因此，掌握细胞分离的基本技术对任何细胞生物学家来说都是非常重要的。

什么是细胞分离？

细胞分离，也被称为细胞分选，是从异质细胞混合物中分离一个或多个特定细胞群的过程。有多种细胞分离的方法，每一种都有其优势和劣势。

为什么科学家们要分离细胞？

通过在分离的细胞上进行实验，科学家可以最大限度地减少样本中其他细胞类型的干扰，从而准确地得到特定的研究结果。分离的细胞可应用于生命科学研究的多个领域，从而使科学家能：

- 对单个细胞类型进行分子生物学分析，包括RNA表达和表观遗传分析
- 通过遗传修饰和扩增特定的细胞类型来进行疾病建模或细胞治疗研究（比如T细胞治疗研究）
- 直接将纯化的细胞用于各种动物模型的过继性细胞移植实验
- 提高分析方法的灵敏度（比如用于HLA分析的细胞分选，用于FISH分析的细胞分选）
- 在体外研究候选药物对特定细胞群的作用（比如血液毒性测试）
- 将富集的浆细胞与骨髓瘤细胞融合以制备杂交瘤

科学家们如何制备用于细胞分选的样本？

有许多不同的方法可以制备样本以获得最佳的细胞分选结果。根据您的起始样本来选择合适的方法，包括从起始样本中去除某些成分或只是简单地制备单细胞悬液。

可以从多种复杂的生物样本中分离细胞，包括：

- 全外周血
- 白细胞单采术产品
- 外周血单个核细胞 (PBMCs)
- 骨髓
- 脐带血

欲了解从血液和组织分离细胞的详细信息，请查阅第[27](#)页和[31](#)页。

细胞分选方法

通常有多种方法可被用于细胞分选。以下我们将讨论常用的几种细胞分选技术，包括他们的优势和限制。

细胞分选方法的选择通常取决于您的研究目的，但是并没有一个完美的方案。例如，如果您需要得到高纯度的细胞，那么细胞得率可能会比较低。

免疫磁珠细胞分选

免疫磁珠分选是一种通过磁珠从细胞群中分离目的细胞的技术。首先，磁珠通过抗体、酶、凝集素或链霉素与目的细胞上特定的细胞表面蛋白结合。接着样本被置于磁场中，经磁珠标记的细胞在磁场的作用下被吸附。未经标记的细胞被保留在上清液中，从而以物理分离的方式分选样本中的目的细胞和非目的细胞。

由于其快速且操作简单，免疫磁珠细胞分选是研究人员分离高纯度的特定细胞亚群的常用方法之一。免疫磁珠细胞分选的优势包括：

- 高纯度
- 快速的实验流程

- 操作简便
- 无需大型仪器
- 高通量
- 可自动化
- 细胞活率高

磁珠细胞分选的方法包括阳性分选（正选）和阴性分选（负选）。当进行正选时，上清液被弃掉，被磁珠标记的目的细胞被保留在磁场中。在当进行负选时，目的细胞则存在于上清液中。



荧光激活细胞分选

荧光激活细胞分选是一种通过流式细胞仪和荧光探针来分离异质性细胞群的方法。被荧光标记的抗体与单细胞悬液中目的细胞上特定的抗原表位结合。标记后，流式细胞仪将细胞悬浮液聚集成均匀的单细胞流。接着细胞流通过一组激光器，细胞结合的荧光团被激发，从而引起光散射和荧光发射。根据激光激发产生的波长，将光子信号转换成一定比例的电子脉冲，这些电子脉冲将电荷分配给细胞周围形成的液滴。当每个液滴经过偏转板之间时，其电荷导致液滴落入收集管或废液器中。



抗体

用于表型和纯度检测

STEMCELL提供一系列针对人或小鼠抗原的抗体，这些抗体已经验证可与STEMCELL的细胞分选试剂盒结合用于特定的下游应用，如流式细胞分析。

www.stemcell.com/antibodies

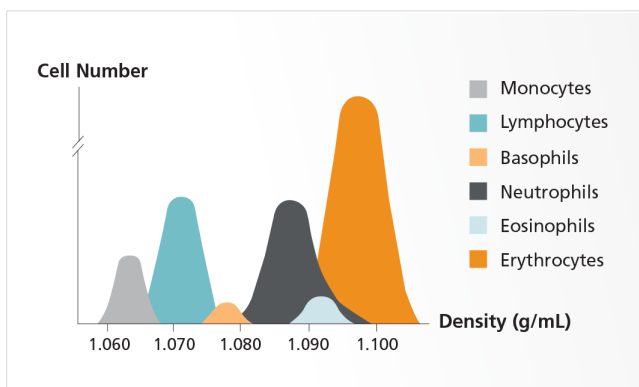
与FACS相比，免疫磁珠细胞分选的操作更快捷、更简便，是分离常见细胞类型的首选方法。而FACS的独特优势在于，它能进行：

- 单个细胞的分选
- 基于细胞内标记物的分选（例如：GFP）
- 基于细胞表面标记物表达水平的分选
- 通过多个标记物分离复杂的细胞类型且纯度要求高

密度梯度离心

密度梯度离心依赖于样本中不同细胞的密度。离心前，将样本加入到密度梯度离心液的上面。离心过程中，每种细胞类型将沉降至其等密度点，即离心液中细胞与离心液密度相同的位置。

密度梯度离心的常见的应用包括外周血中单个核细胞的分离，细胞培养物中死细胞去除以及从血细胞中分离血浆。密



度梯度离心液有多种类型，每种都有不同的特性以适用于特定的研究目的。以下是一些常用的密度梯度离心液：

- [Lymphoprep™](#)，[Lympholyte®](#)以及[Ficoll-Paque®](#)是由糖类物质和泛影酸钠组成的类似的离心液，它们具有相同的密度1.077 g/mL。这些离心液通常用于从外周血、脐带血和骨髓中分离单个核细胞。
- [Percoll®](#)（密度：1.131 g/mL）是由聚乙烯吡咯烷酮（PVP）包被的硅胶颗粒组成，被广泛用于分离细胞、细胞器、病毒和其他亚细胞颗粒。
- [OptiPrep™](#)是一种由碘克沙醇水溶液组成的离心液，用于分离病毒、细胞器、大分子和细胞。

密度梯度离心是一种非常经济的细胞分选技术，但其分选的细胞特异性有限，纯度低且通量低。虽然它是常见的实验室技术，密度梯度离心也是一个难以掌握的、缓慢且费力的操作过程。操作者通常需要小心地将样本加至密度梯度离心液之上，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层。而SepMate™技术能让密度梯度离心变得更容易、更快捷。



Lymphoprep™

密度梯度离心液

利用Lymphoprep™密度梯度离心液与细胞密度的差异，轻松从外周血、脐带血和骨髓分离单个核细胞。

www.stemcell.com/lymphoprep



SepMate™

轻松分离PBMC

使用SepMate™分离PBMC只需15分钟。SepMate™是一种特殊的离心管，能帮助用户快速地将血液加至密度梯度离心液之上，防止离心液与血液样本混合，轻松收集目的细胞。

www.SepMate.com

免疫密度细胞分选

免疫密度细胞分选, 也被称为红细胞玫瑰花结分选, 它是一种将抗体标记和密度梯度离心相结合的分选的方法。在这种方法中, 抗体直接标记全血中的非目的细胞, 并将其与红细胞 (RBCs) 交联, 从而形成比分离的单个核细胞密度更大的免疫玫瑰花结状复合物。经过离心, 非目的细胞与红细胞被沉淀, 而目的细胞则被留在密度梯度离心液之上。

免疫密度细胞分选无需任何离心机以外的特殊设备, 能轻松整合到已有的密度梯度离心操作流程中, 并且能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, 依赖于实验者对血液样本的分层技术, 且要求起始样本中有较高浓度的红细胞。

[RosetteSep™](#) 是一款商业化的免疫密度细胞分选试剂 (图1)。[RosetteSep™](#) 可与 [SepMate™_PBMC离心管](#) 结合使用, 更快速、简单地进行免疫密度细胞分选。



RosetteSep™

免疫密度细胞分选

使用RosetteSep™在密度梯度离心过程中直接从人全血中分离出高纯度的细胞, 简化您细胞分选的实验流程。

www.RosetteSep.com

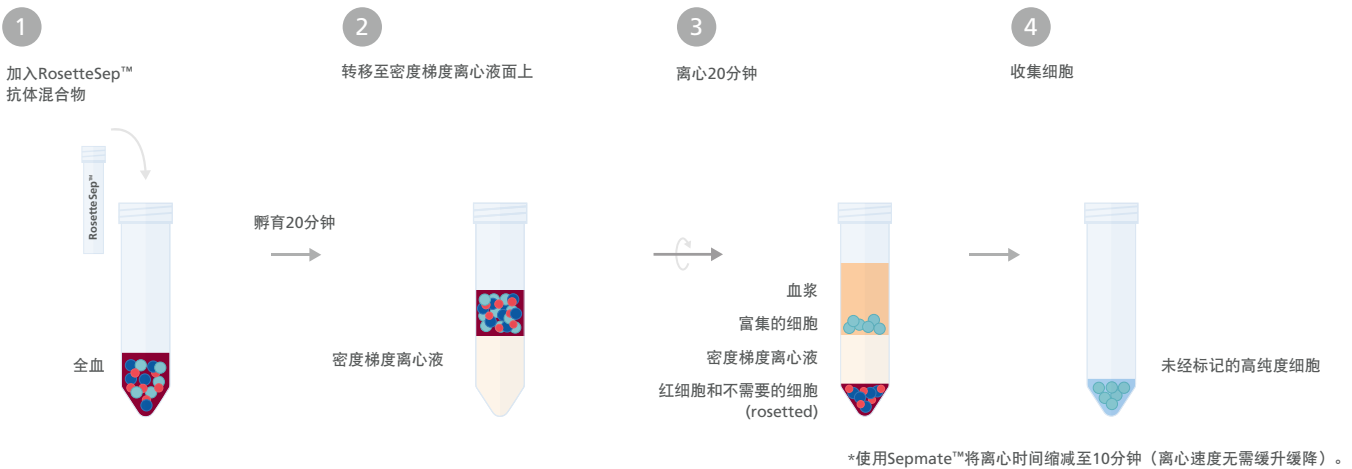


图1. 常规的RosetteSep™ 细胞分选操作流程

沉降法

沉降法基于重力的原理使体积和密度更大的组分比体积和密度较小的组分沉降速度更快。由于样本中体积和密度最大的组分具有高沉降速率，因此它们可以通过初始的低力离心沉降。上清液可再次离心。通过多次连续离心，具有越低沉降速率的组分将被分离。通常通过葡聚糖沉降法来分离白细胞和红细胞。[HetaSep™](#)是一款基于红细胞聚集从全血中分离有核细胞的试剂。

沉降法非常的经济，但是其纯度通常比其他细胞分选方法低很多。

粘附法

基于不同类型的细胞独有的粘附能力可从异质细胞群中分离目的细胞。通过选择合适的生长因子和细胞培养板来选择性地促进或抑制细胞的粘附能力，进而从悬浮液中分离被粘附的细胞。例如，使用血清和分化的抗体混合物来培养单核细胞，能促进具有粘附力的巨噬细胞单层的形成。在移除含非目的细胞的上清液后，即可分离巨噬细胞。

此外，将异质细胞群培养在超低粘附力的培养板上，即可分离那些悬浮生长的或者失去贴壁能力的细胞。如果没有可粘附的表面，贴壁细胞将无法存活，目的细胞将被保留在悬液中¹。

微流控细胞分选

微流控是一类细胞分选方法的总称²。通过在微观水平上操控流体来进行单细胞分离，微流控技术经常在微芯片上进行，通常也被称为“芯片实验室”。当所用样本和试剂的体积很小时，微流控技术具有很大的优势。此外，芯片实验室是便携的，几乎可以在任何地方使用，因此特别适合作为现场诊断的工具。

微流控细胞分选方法分为主动式和被动式。主动式微流控技术需要借助外力，而被动式微流控技术需要结合重力与细胞的密度及质量。这些方法也可以根据细胞是否被标记进行分类。尽管一些方法需要使用抗体对细胞进行标记，但是大多数方法无需标记细胞。以下几种不同的微流控细胞分选的方法：

- 超声波分选法
- 双水相系统
- 仿生微流控分选法
- 亲和性分选法
- 确定性侧向偏移法
- 电泳分选法
- 场流分级
- 重力与沉降法
- 磁泳法
- 微滤法
- 光分选法

其他细胞分选技术

这一部分总结了其他不常用的细胞分选方法。

适配体技术

适配体是单链RNA或DNA寡核苷酸，能与相应的靶物质进行高特异性的结合。通过指数富集的配体系统进化技术（SELEX），可以筛选和合成靶向任何细胞类型的适配体。这些适配体对其靶向物质具有高亲和力和特异性，并且可被荧光染料或磁珠标记，从而进行细胞分选。适配体的主要优势是具有低免疫原性。

荧光团标记的适配体已用于从骨髓中分离间充质干细胞³，RNA适配体已用于分离小鼠胚胎干细胞²。

浮力激活细胞分选

浮力激活细胞分选是一种利用微泡和抗体来特异性标记目的细胞的技术。当与样本混合时，微泡与目的细胞结合。由于浮力增大，微泡上浮到表面，从而分离目的细胞。

补体消耗

补体消耗方法利用免疫系统的补体系统启动蛋白水解级联。补体系统由可被病原体或抗体激活的血浆蛋白组成。一旦被激活，血浆蛋白诱导细胞上膜攻击复合物的形成，导致细胞裂解。使用特异性单克隆抗体，可以通过补体级联靶向和裂解任何细胞群。

激光捕获显微切割

激光捕获显微切割（LCM）是一种利用低能激光从大多数实体组织样本中切割目的细胞或目的组织区域的技术。在显微镜下，LCM能通过细胞形态或特异性组织学和免疫学染色从异质性细胞群中分离目的细胞。LCM特别适用于处理小体积样本。

免疫导向激光捕获显微切割

免疫导向激光捕获显微切割将免疫染色和激光捕获显微切割相结合。这种方法不仅使用了形态学和组织定位，还通过免疫表型来鉴别和从组织样本中分离目的细胞。该技术通过免疫组织化学或免疫荧光来指导分离表达特定分子标记的细胞的过程，尤其是当组织学染色并不能识别某些特定细胞群时。

有限稀释法

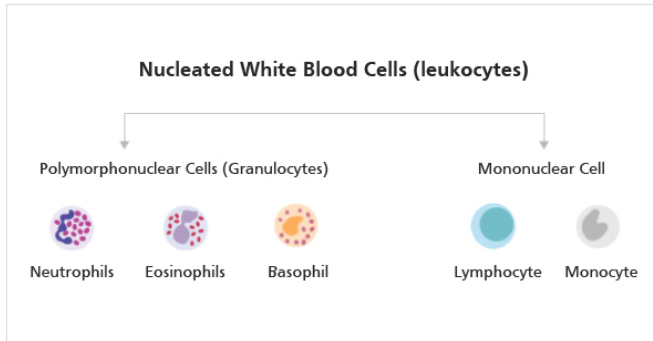
有限稀释法通过对细胞悬液进行稀释来分离单个细胞。该技术能使用标准的移液工具进行操作，通常分离用于单个细胞分析的单克隆细胞培养物和单个细胞培养物⁴。

显微操作

显微操作，通过手动进行细胞分选，是一种使用倒置显微镜和连接了吸取及释放组件的超薄玻璃毛细管进行细胞分选的技术。该系统通过电动机械台进行移动，使操作者能精确挑选目的细胞，并通过微量移液管吸取和分离细胞。

从血液分离细胞

可以通过多种方式处理血液来获得细胞制备物，以直接用于生物学实验或者再进一步分离特定的细胞亚群。在选择细胞分选方法时，选择能降低错误风险并简化实验流程的技术尤为重要。



全血由血浆、红细胞 (RBCs)、血小板和有核白细胞 (也称为白细胞) 组成。白细胞可以进一步分为单个核细胞和多形核细胞 (或粒细胞)。这里, 我们将讨论通过不同的方法从全血中分离外周血单个核细胞 (PBMC)、多形核细胞、白细胞或特定细胞亚群。

去除红细胞

样本中的RBCs污染可能影响下游分析。因此, 分离特定的细胞亚群以用于功能性研究或下游实验时, 通常会要求在细胞制备过程中去除红细胞。常用的去除红细胞的方法有以下几种:

- 氯化铵裂解RBC
- 沉降法 (如葡聚糖沉淀或HetaSep™)
- 免疫磁珠细胞分选 (如EasySep™红细胞去除试剂)
- 低渗裂解

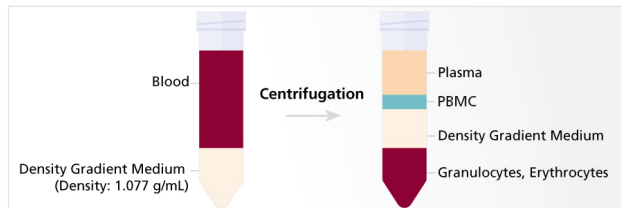
去除红细胞后, 样本中剩下的所有有核白细胞 (白细胞), 可用于下游实验或进一步分离特定的细胞亚群。

EasySep™ RBC去除试剂
无需裂解、洗涤或离心的RBC去除方法

通过免疫磁珠去除RBCs以获得高纯度的白细胞, 得到的细胞未经标记, 并可立即用于下游应用, 包括细胞培养、RNA提取或酶活性测试。

制备外周血单个核细胞

PBMCs中有淋巴细胞 (T细胞、B细胞和NK细胞)、单核细胞和树突状细胞, 被定义为有圆形细胞核的白细胞。从全血制备PBMCs是分离特定免疫细胞亚群之前常见的一个步骤。最常用的PBMC分选方法是使用密度梯度离心液 (比如 [Lymphoprep™](#)) 进行离心。该方法利用了血液中不同细胞与密度梯度离心液的密度差异。



首先用PBS稀释全血，再将其小心地加至密度梯度离心液上层。离心后，具有较高密度的细胞（粒细胞和红细胞）通过密度梯度离心液沉降至离心管底。而PBMCs停留在密度梯度离心液和血浆中间的界面，从而可被收集。欲了解通过密度梯度离心从全血分离单个核细胞的具体实验步骤，请参阅第28页。

小窍门：是否担心在处理多个样本时这种方法非常的耗时？那么来试试[SepMate™离心管](http://www.SepMate.com)吧，它能使您的操作更快捷、简单（www.SepMate.com）。

此外，还可以使用[EasySep™ Direct人PBMC分选试剂盒](#)通过免疫磁珠法从全血中直接分离PBMCs，无需离心或裂解，短至20分钟即可得到纯化的PBMCs，且可用于全血、脐带血、骨髓、白膜层和白细胞单采样本。STEMCELL也提供[冻存的PBMCs](#)。

注意：粒细胞的密度将随着血液样本存放时间而改变，因此，若从存放时间较长的血液样本中分离单个核细胞时，可能会有粒细胞污染。欲了解从存放时间较长的血液样本去除粒细胞的实验流程，请参阅第30页。

获得PBMCs后，可通过免疫磁珠细胞分选或其他细胞分选技术从中分离特定的细胞亚群。

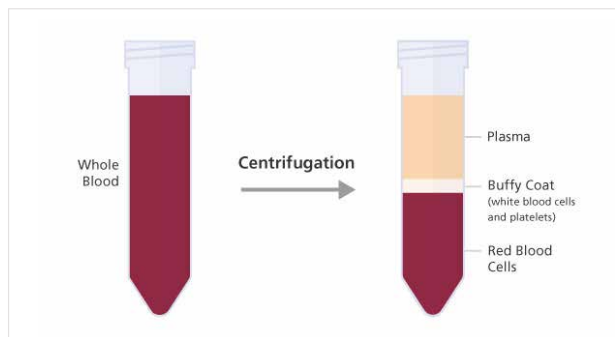
外周血多形核细胞的制备

多形核细胞，也被称为粒细胞，是一类含有溶酶体颗粒的免疫细胞亚群，这些溶酶体颗粒会在细胞激活后被释放。可通过以下任意方法从全血中获得多形核细胞：

- 制备外周血多形核细胞，需要先进行密度梯度离心，然后使用氯化铵裂解（详细实验流程请参阅第27页）。再通过免疫磁珠细胞分选技术从多形核细胞混合物中分离特定的粒细胞群，比如中性粒细胞、嗜碱性粒细胞或嗜酸性粒细胞。
- 使用[EasySep™ Direct](#)细胞分选技术直接从血液分离粒细胞，无需裂解或密度离心，让您快速、简便地获得pan-粒细胞或者其他特定的粒细胞亚群（比如中性粒细胞、嗜碱性粒细胞或嗜酸性粒细胞）

白膜层的制备

白膜层是白细胞的浓缩悬液，可通过低速离心从白细胞中去除红细胞和血浆获得。



这种方法让您能集中处理大量样本，并且去除供者特异性可溶性血清因子，以减少供者的可变性。从全血或骨髓制备的白膜层能作为起始样本，通过免疫磁珠细胞分选技术（比如[EasySep™](#)）来分离特定的细胞群。欲了解制备白膜层的详细实验流程，请参阅第29页。



EasySep™

快速、简便的免疫磁珠细胞分选

使用EasySep™，可在短至8分钟内快速、简便地分离细胞，且无需分离柱。只需一次简单的倾倒，得到的细胞可立即用于下游应用。

www.EasySep.com

从全血中直接分离特定的细胞亚群

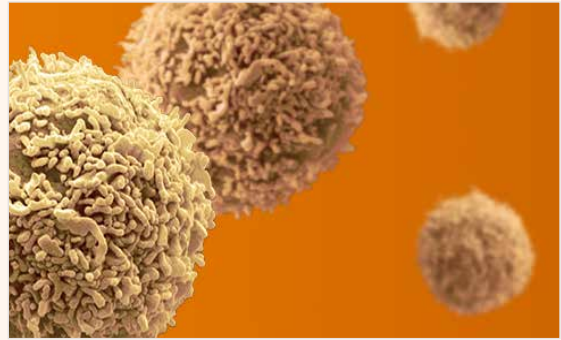
一些细胞分选技术（比如EasySep™ Direct和RosetteSep™）能让您直接从全血中分离特定的细胞亚群，而无需先分离PBMCs。

从单样本分离细胞

单采术是从个体中抽取全血，将其中不同的成分分开，再将去除了特定成分（如血浆、血小板或白细胞）的血液回输到个体的过程。

白细胞单采术是从供者循环血中收集白细胞的过程。相比于全血和白膜层，单位体积的白细胞单样本中有更高浓度的白细胞，是用于分离单个核细胞理想的起始样本。根据您的选择的细胞分选方法，白细胞单采样本可被用于分离PBMCs，也可在细胞分选前先进行RBCs去除。

血小板单采术是单采术的另一种形式，是将凝血细胞（通常被称为血小板）与血液中其他部分分离的过程。在此过程中可从血小板中去除白细胞，少量高浓度的白细胞被收集到白细胞去除收集管（LRSCs）中。在对供者进行常规血小板单采后，LRSCs通常被丢弃，但它是用于研究目的的一个很好的白细胞来源，可替代PBMCs作为起始样本。



人原代细胞

STEMCELL提供高品质且合规的原代细胞，帮助您简化实验流程。

www.stemcell.com/PrimaryCells



EasySep™ Direct

从血液直接分离细胞

使用EasySep™ Direct，通过免疫磁珠去除红细胞和非目的细胞，只需一步即可快速从全血分离高纯度的细胞，无需密度梯度离心、沉降或RBC裂解。得到的细胞可立即用于下游实验，如基因表达分析、功能性检测和流式细胞分析。

www.EasySepDirect.com

从脐带血分离细胞

脐带血可在出生后从胎盘和脐带收集。从脐带血中分离的免疫细胞可用于早期免疫应答研究。为了从脐带血中分离特定细胞群, 可以首先使用密度梯度离心液 (例如[Lymphoprep™](#)) 通过离心来制备单个核细胞, 或者先简单地去除RBCs。

从脐带血中去除红细胞需要考虑周详。标准的氯化铵裂解法可能对脐带血中造血或免疫祖细胞的伤害较大。其他用于红细胞去除的方法 (如[EasySep™](#)、[ErythroClear™](#)、[HetaSep™](#)) 可能更适合。

此外, 还需要注意的是脐带血中血小板含量很高, 可能会引起凝血。因此使用合适的抗凝剂, 如酸性柠檬酸葡萄糖 (ACD) 或EDTA, 并严格按照有关脐带血的产品说明书来处理样本非常重要。

制备组织样本

从完整的组织中分离细胞时，必须先通过机械法或酶解法来破坏将细胞连接在一起的细胞外基质。因此当需要使用基于细胞标记的细胞分选技术时，制备单细胞悬液非常重要，因为未被完全解离的细胞团可能导致靶细胞的无效标记。此外，也必须确保所采用的操作方法不会影响细胞表面的抗原表位，以避免影响细胞分选和下游功能性分析。

常用的组织解离酶包括：

- [胶原酶](#)可水解胶原蛋白，被广泛用于从动物组织中分离细胞。
- [透明质酸酶](#)通常与胶原酶结合使用并催化1,4-β-D-糖苷键的水解。
- [DNase](#)可减少由于受损细胞释放DNA而产生的细胞团块。
- [弹性蛋白酶](#)被用于消化含有大量弹性蛋白的组织。
- [胰蛋白酶](#)是能特异性作用于肽键的丝氨酸蛋白酶，通常与其他酶（例如弹性蛋白酶或胶原酶）结合用于组织解离。

为了最大化细胞回收率和活率，必须对组织解离条件进行优化（如酶的浓度、酶的类型和孵育时间）。欲了解详细的组织解离实验指南，请参阅第31页。

但是即使经过优化，在解离组织的操作中也可能导致一些细胞的死亡。为了确保凋亡细胞不会干扰您的实验，在进行细胞分选或下游分析之前，使用[EasySep™死细胞去除 \(Annexin V\) 试剂盒](#)可将它们从样本中去除。

制备淋巴组织样本

脾脏是富含免疫细胞的淋巴组织。若需要从淋巴组织分离免疫细胞亚群，可通过机械法从脾脏制备单细胞悬液。欲了解从小鼠脾脏制备单细胞悬液的常用实验流程，请参阅第33页。

从其他淋巴组织（如淋巴结）制备单细胞悬液，可使用类似的操作流程。

获得单细胞悬液后，即可使用合适的细胞分选技术（如免疫磁珠细胞分选）来分离特定的细胞亚群（第4页）。



制备非淋巴组织样本

从非淋巴组织分离的免疫细胞通常可用于研究组织驻留免疫细胞的表型和功能，或检测特定疾病部位的免疫反应。根据您的组织类型和需要的目的细胞，制备单细胞悬液的方法可能会有所不同。第31页和我们的产品说明书列举了一些用于制备非淋巴组织的常见组织解离方法，包括中枢神经系统、小肠和肺组织。

细胞分选结果的评估

评估细胞分选的结果时需要考虑多个参数。通过对这些参数进行比较来选择细胞分选的方法非常有用。对一些关键性的参数比如纯度和回收率进行评估是非常必要的。对其他重要参数的评估可能会根据您目的细胞的下游应用而有所不同。这里，我们列举了在选择细胞分选方法时可能需要考虑的一些参数。

纯度

纯度是指目的细胞在最终分选所得的细胞含量中的比例，通常表示为活细胞的百分比。纯度是评价细胞分选是否成功的重要标准，因为它表明最终分离得到的细胞是否含有足量的目的细胞，而没有其他类型细胞干扰。

通常使用流式细胞术进行纯度测定，即使用荧光标记细胞，再使用流式细胞仪进行分析。

当准备通过流式细胞术分析的细胞时，应慎重选择染色抗体，同时要考虑所涉及的特定细胞类型和所用的细胞分选方法（正选或负选）。通过免疫磁珠负选分离得到的细胞可使用针对细胞表面标记表位的抗体进行染色。正选用到的抗体会与目的细胞结合并可能会部分或者完全占据细胞表面的抗体表位，在这种情况下，应使用目的细胞表面其他抗原表位进行纯度检测。例如，如果用于CD3⁺细胞正选的抗体部分或完全占据了其他CD3抗体克隆的表位，则可以使用CD4和CD8抗体对得到的T细胞群进行流式细胞分析。此外，可以使用特异性结合一级标记抗体的荧光染料偶联的二级抗体对分离的细胞进行染色。如果您使用的是STEMCELL的细胞分选产品，可参阅相应的产品说明书以获取推荐的可用于分析您分离细胞的抗体克隆号。

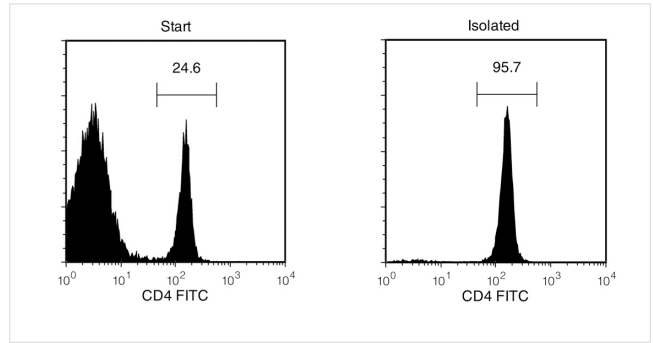


图2. 使用EasySep™小鼠CD4⁺ T细胞分选试剂盒分离前和分离后的小鼠CD4⁺ T细胞纯度

回收率

回收率是指目的细胞在分离后和分离前的含量的比值。回收率解决了以下问题：您实际能从样本中分离出多少目的细胞，以及您在分离细胞的过程中损失了多少目的细胞。理想情况下，回收率即为起始样本中目的细胞的百分比。

纯度和回收率往往成反比。研究人员需要平衡实验中对细胞的纯度和细胞的数量要求。欲了解如何计算细胞分选后的回收率，请参阅第23页。

得率

得率是指回收的目的细胞的总数。可通过每份起始样本中分离出的细胞数量,或最终分离的目的细胞的总数来表示。回收率越高,得率就越高。回收率和得率受到多种因素的影响,包括制备的样本质量、样本的类型、目的细胞的起始比例、起始样本的异质性以及细胞分选试剂盒的性能。

细胞活率

活率可表示为分离所得的所有细胞中活细胞的百分比。当研究人员需要活细胞进行下游细胞培养和其他应用时,活率尤其重要。您可能还需要最小化样本中死细胞的数量,因为死细胞会释放出促进细胞死亡或邻近细胞应激反应的因子。

常用的测定细胞活率的方法是评估细胞膜的完整性。可使用活细胞染料,包括7-AAD和台盼蓝,来对死细胞进行染色。

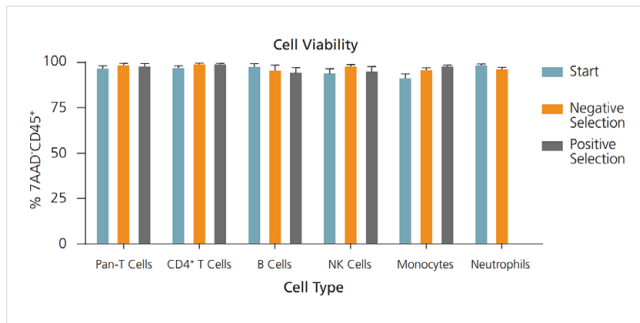


图3. 使用EasySep™分离的细胞显示出与起始样本相当的细胞活率

功能性

您分离后得到的目的细胞应仍具有功能性,以确保您下游的体外或体内试验能准确地测定您目的细胞的生理功能。有很多评估细胞功能性的方法,应根据您的目的细胞类型和特定的研究方向来选择合适的方法。例如,若您想分离功能性的T细胞,您可能需要测定细胞因子在是否有刺激的情况下的表达情况,以确保T细胞做出适当的反应。

可重复性

可重复性在科学研究中非常重要。差异性会降低您检测统计显著性和得到有意义的结果的能力。导致差异的因素众多,包括操作时间,样本间的差异,样本处理量以及实验操作人员。您使用的细胞分选试剂的质量也可能会影响可重复性。

细胞标记

通过抗体或配体对细胞进行标记是负选和正选分离细胞方法中的关键步骤。通过适当的标记,所使用的抗体或配体和磁珠能有效地分离细胞,而不会干扰下游应用。样本标记不足会导致目的细胞的回收率降低(正选)或所需细胞的纯度降低(负选)。而过度标记存在标记试剂与非目的细胞非特异性结合的风险。

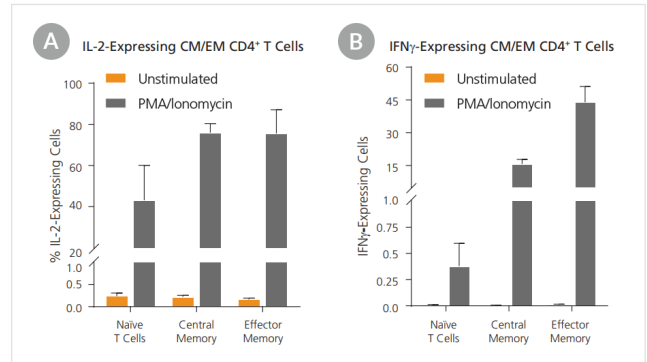


图4. 使用EasySep™分离的中央记忆和效应记忆CD4+T细胞在受到刺激后产生细胞因子

您可以采取许多步骤来防止样本中细胞的标记不足或过度标记(包括非特异性结合)。大多数厂商会为您提供使用其细胞分选产品的详细操作说明,这些操作说明经过其产品开发者精心优化以确保您正确地使用试剂。

速度

速度是指完成细胞分选过程所花费的时间,速度会间接影响上述评价指标。如果您需要提高通量或只是想在实验中节省时间完成更多工作,则需要使用更快的细胞分选方法。STEMCELL最快的细胞分选试剂盒可以在8分钟内分离出高纯度的细胞,欲了解更多,请浏览www.EasySep.com。

通量

通量是指以样本体积、细胞数量或者样本量为单位完成细胞分选的速度。在一次细胞分选实验中您能分离多少细胞?您能同时处理多少样本?如果您想一次处理大体积的样本或者同时处理多个样本,则需要考虑哪种细胞分选技术能达到您想要的通量。

操作简单

操作简单有助于提高细胞分选方法的可靠性和可重复性,特别是对于实验新手而言。简单的细胞分选操作方法是减少用户间错误率及差异性的关键。

样本和细胞类型

样本和细胞类型能决定您能采用何种细胞分选技术。例如，市面上有免疫磁珠细胞分选试剂盒可用于从小鼠肺中分离ILC，但可能没有针对从脂肪组织中分离Th2细胞的试剂盒。如果市面上没有针对特定细胞或样本类型的细胞分选产品，只要有合适的抗体来识别目的细胞，也可以定制流式分选和免疫磁珠分选试剂盒。

在某些情况下，您可能希望从单个样本中分离出多种细胞类型。一些分离细胞的方法和技术可以满足您进行连续细胞分选。

连续分选需要注意：

- 目的细胞的正选必须在未被磁珠标记的细胞群上进行：
(a) 原始的起始样本，(b) 正选中倾倒入来的细胞，(c) 使用EasySep™ Release试剂盒正选后磁珠被解离的细胞，或
(d) 负选中倾倒入来的细胞或富集的细胞群。
- 我们推荐先分离最稀有的细胞类型（最小化减少细胞损失），最后分离占比最多的细胞类型。若您有关于连续分选的任何问题，请通过info.cn@stemcell.com与我们联系。

成本

成本通常是影响您决策的关键，尤其是在项目基金有限的情况下。在评估细胞分选方法的成本时，请记得囊括所有的成本，包括试剂（比如抗体、磁珠和密度梯度离心液），耗材（例如试管、离心管和分离柱），以及时间和技术成本（例如流式细胞仪的预订）。应在不影响实验结果的前提下节省成本。

自动化

自动化能减少实验可变性及手动操作的时间，以允许您在实验室中开展更多的工作。自动化的细胞分选仪器，比如[RoboSep™](#)，还可以降低实验人员暴露于危险病原体的风险。

关于磁珠细胞分选的常见问题

磁珠分选, 也被称为免疫磁珠细胞分选, 包括使用针对特定细胞表面抗原的抗体或配体标记细胞进行选择或去除。被标记的细胞与磁珠交联, 一旦被置于磁场中, 即可被吸附。

由于其快速性和简便性, 磁珠分选是科学家分离高纯度的特定细胞亚群最常用的方法之一。

这里概述了一些关于磁珠细胞分选常见问题。

应该选择有柱式还是无柱式的磁珠分选方法?

免疫磁珠分选有两种方式: 有柱式分选和无柱式分选。



RoboSep™细胞分选仪

全自动的,“无人值守”的细胞分选

RoboSep™ -S和RoboSep™ -16能全自动完成EasySep™流程中细胞标记和分选的所有步骤, 最大限度地减少样本处理工作, 节省技术人员的时间。

www.RoboSep.com



所谓有柱式磁珠分选,即被磁珠标记的细胞需要流经一个置于磁场内的分离柱从而实现目的细胞分离的过程。这个分离柱内由一些微小铁珠构成,当这些铁珠被置于磁场中时会被磁化,从而产生一个可吸附被磁珠标记的细胞的局部磁场。当使用正选时(图5),未被磁珠标记的非目的细胞可以通过分离柱,而被磁珠标记的目的细胞则保留在分离柱中。当将分离柱移出磁场后,可通过缓冲液洗脱得到目的细胞。

然而在有柱式磁珠分选流程中,需要多次的洗涤细胞以避免分离过程中的交叉污染,并且每次分选时都需要更换新的分离柱,因此这种分选方法使得实验成本更高,实验流程更复杂,且费时费力。

此外,因为堵柱子而损失珍贵样本的情况在有柱式磁珠分选的过程中非常常见,特别是当使用的组织样本含有大量的细胞碎片时。

所谓无柱式磁珠分选,即直接将磁珠标记的样本置于磁场内从而实现目的细胞分离的过程。被磁珠标记的细胞由于磁场的作用被吸附在试管壁上。而未被标记的细胞则可通过倾倒入或移液器吸出。将试管移出磁场后,被标记的细胞则会从试管壁上脱离,悬浮于试管内。当使用正选时(图6),被标记的目的细胞被留在试管内,可立即用于下游应用。

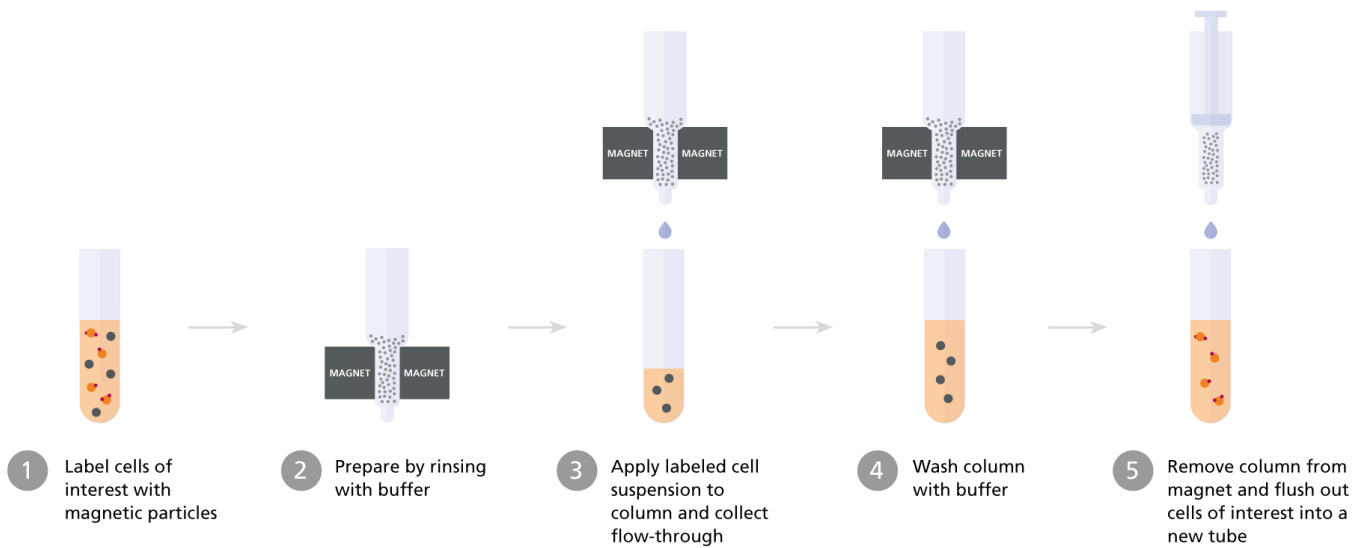


图5. 有柱式磁珠细胞分选的正选操作流程

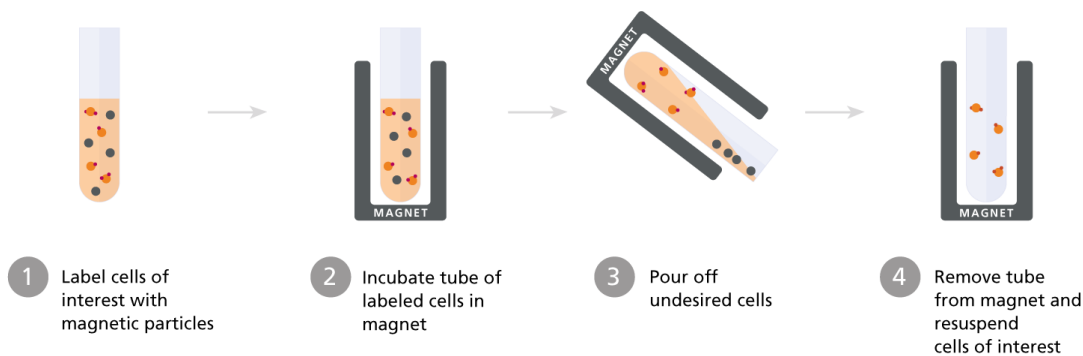


图6. 无柱式磁珠细胞分选的正选操作流程

应该选择哪种磁珠分选方法呢? 通常来讲, 有柱式和无柱式分选技术都可得到高纯度的细胞。这两种技术已被科研人员广泛用于多个研究领域中超过20年, 且发表了数千篇文献。在竞争日益激烈的研究环境中, 我们建议选择最有效的技术帮助您以更少的时间和更少的精力完成细胞分选及下游实验。我们认为, 无柱式磁珠细胞分选技术是最高效地获得高纯度细胞的方法。

应该使用磁珠分选还是流式分选?

磁珠分选和流式分选 (FACS) 是最常用的两种分离特定细胞群的方法。两种方法的选择取决于您将进行何种下游应用。

与FACS相比, 免疫磁珠细胞分选的操作更快捷、更简便, 并且通常作为分离常见细胞类型的首选方法。然而与磁珠分选不同, FACS可以:

- 单个细胞的分选
- 同时依次分选多个细胞类型
- 基于细胞内标记物的分选 (例如: GFP)
- 基于细胞表面标记物表达水平的分选
- 通过多个标记物分离复杂的细胞类型且纯度要求高

在选择细胞分选方法时, 首先需要了解磁珠细胞分选试剂盒预期的细胞纯度是否能满足您的实验要求。您可以在供应商的网站找到相关产品的实验数据。若供应商未公开他们细胞分选产品的实验数据, 您可与他们直接联系索要相关信息或产品小样以在您的实验室进行测试。由于其快速性和简便性, 磁珠细胞分选技术比复杂的流式分选更容易被整合到您的实验设计中。

当然, 磁珠分选和流式分选也可结合使用。在进行流式分选前, 使用磁珠分选技术预富集您的样本, 能最大化提高细胞得率和纯度, 并且缩短分选时间, 特别是在样本量较大或需要分选稀少的细胞类型时。

正选和负选的区别是什么?

免疫磁珠阳性分选 (正选), 是使用靶向细胞表面特定蛋白的抗体或配体直接标记目的细胞以进行分选。目的细胞被抗体标记后与磁珠连接, 随后放入磁极中进行孵育, 最终目的细胞因被磁场吸附而保留于试管中, 上清液被倾倒去除。正选具有以下特点:

- 分离的细胞纯度高
- 分离的细胞通常与抗体和磁珠相连
- 抗体混合物可与目的细胞表面特定的标记物相连
- 可从负选得到的细胞中继续分选其他细胞

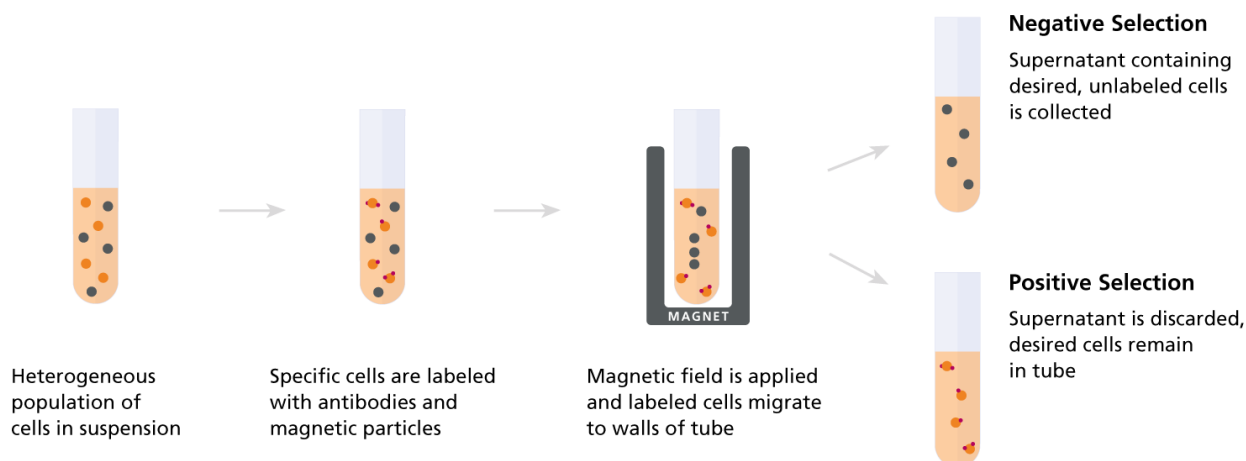


图7. 正选与负选方法的比较

免疫磁珠阴性分选 (负选) 是使用靶向细胞表面特定蛋白的抗体或配体标记非目的细胞以将其去除。非目的细胞被抗体标记后与磁珠连接, 随后放入磁极中进行孵育, 最终非目的细胞因被磁场吸附被保留在试管中, 而被标记的细胞可以通过上清液来收集。由于目的细胞没有被抗体或配体特异性标记, 因此不会和磁珠相连。负选具有以下特点:

- 目的细胞未与磁珠相连
- 最小化样本处理步骤从而使得操作流程更快更简单
- 抗体混合物只靶向所有非目的细胞

若您有任何疑问, 请通过info.cn@stemcell.com联系我们, 查看我们是否有关于您特定应用的任何数据或建议。下面是免疫磁珠细胞分选的常见应用实例和我们推荐的分选方法。

针对我的研究应用应该如何选择正选和负选的方法?

负选和正选方法 (图7) 的选择最终取决于您的下游应用。对于大部分的下游应用, 正选中被标记了抗体和EasySep™磁珠的细胞并不会影响下游实验。然而, 您应该始终慎重考虑您的下游研究应用是否必须使用未被标记的细胞, 尤其是以下几种情况:

- 已知与细胞表面抗原结合的抗体会导致不需要的细胞内信号传导
- 与细胞表面蛋白结合的抗体或磁珠会影响细胞的下游使用

流式分选前 (FACS) 通过负选快速预富集目的细胞

通过流式细胞分选 (FACS) 分离稀有细胞类型可能非常耗时。研究人员可以通过免疫磁珠细胞分选来预富集目的细胞, 从而大大减少所需的细胞分选时间。在这种情况下, 需要快速的操作步骤和高回收率来为接下来的流式分选节省时间并最大化目的细胞产量。负选通常是一种理想的方法, 因为其快速、回收率高且不标记目的细胞。可以让研究人员在FACS中使用任意带有荧光的针对特定细胞表面标记的抗体。



定制的EasySep™细胞分选试剂盒

满足您特定需求的解决方法

需要分选非常特别或稀有的细胞类型? STEMCELL能帮助您定制细胞分选试剂盒, 或者将您的抗体与EasySep™间选试剂盒结合使用。

欲了解更多信息, 请访问www.stemcell.com/services/custom-cell-separation.html

可在FACS上游对多种特定细胞亚群进行预富集, 包括抗原特异性细胞、辅助性T细胞亚群、B细胞和先天性淋巴细胞 (ILCs)。

使用间接正选来分离罕见的细胞类型

对于没有特定的商品化细胞分选试剂盒的罕见细胞的分离, 可以使用间接正选。这种方法让您可以使用自己的一抗来标记目的细胞。接着, 通过常用的二抗将磁珠连接到一抗标记的靶细胞上来实现免疫磁珠细胞分选。通过这种方法, 可间接正选分离几乎任何细胞类型。

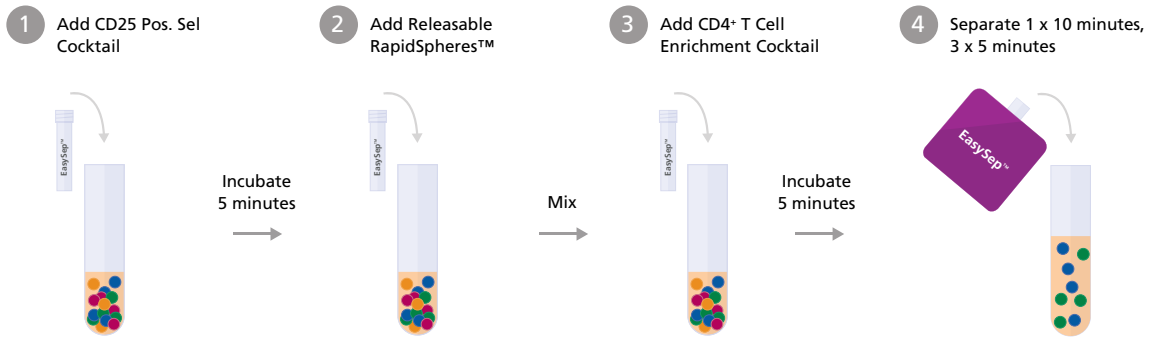
方便的是, 一些细胞分选厂商也提供定制的细胞分选试剂盒, 可以针对特定细胞来源、种属、细胞类型或目的细胞表面抗原。例如, [定制EasySep™试剂盒](#)让您能分离或富集任何感兴趣的细胞类型。

结合不同分选方法以分离复杂或多种细胞类型

复杂的细胞类型可能需要结合使用负选和正选以获得高纯度的目的细胞。例如, 分离CD4+CD127lowCD25+调节性T细胞 (Tregs) 可能具有挑战性, 由于其分选需要基于三种不同的细胞表面标记。而负选和正选结合使用的策略使其分选变得容易。参见图8, 了解我们[EasySep™人CD4+CD127lowCD25+调节性T细胞分选试剂盒](#)的操作流程。

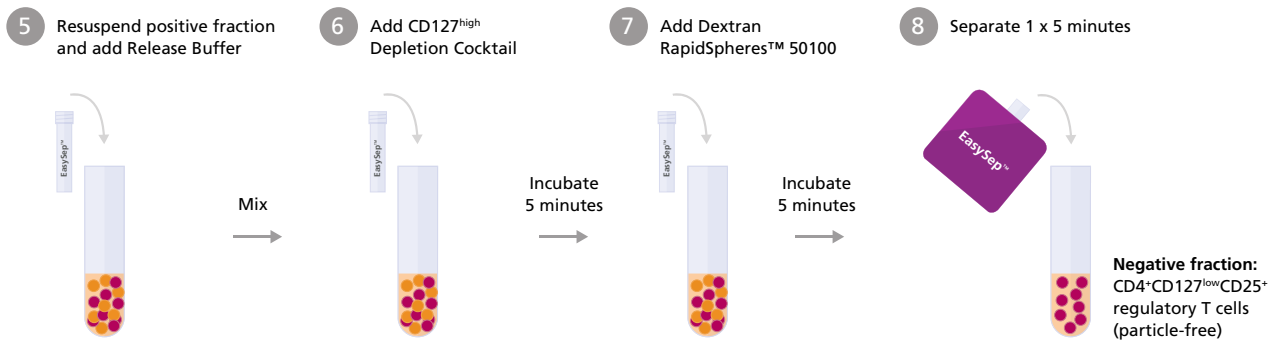
您也可以通过依次分选流程从单一样本中分离多个细胞类型。当您的样本量有限并且您不愿意将样本分成多份时, 依次分选的方法尤其有用。

Positive Selection & Pre-labeling:



Positive fraction

Particle Release, Negative Selection & Depletion:



Negative fraction

Negative Selection (optional) :

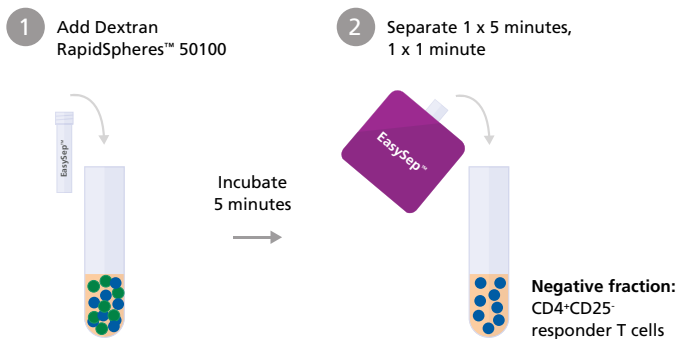


图8. 使用EasySep™人CD4⁺CD127^{low}CD25⁺调节性T细胞分选试剂盒（产品号 #18063）的操作流程

实验流程和技术窍门

常规实验流程和窍门

评估您的起始样本和计算细胞分选后的回收率

在进行细胞分选前, 保留一小部分起始样本是非常重要的。这样有助于评估分选前样本中目的细胞的比例及分选后该细胞的回收率。

各种组织和细胞来源中的细胞比例可以根据已发表的数据来估算。然而, 您感兴趣的细胞的实际比例可能因供体而异, 并且取决于是否来自正常的、患病的还是转基因的样本。

细胞回收率:

计算分选后的细胞回收率是评估实验是否成功的宝贵工具。

细胞回收率的计算需要准确地得到以下四个数据:

1. 分选前起始样本中的细胞总数#*
2. 目的细胞在起始样本中的比例%*
3. 分选后的细胞总数#
4. 分选后目的细胞的纯度%

通过以下公式计算细胞回收率:

$$\% \text{ Recovery} = \frac{(\#3) \times (\#4)}{(\#1) \times (\#2)} \times 100$$

*为方便起见, 您可以在实验结束时将预留的等量的起始样本与分选后(富集)的样本一起进行分析。

细胞总数:

起始样本和富集样本中的细胞总数可以通过精确的细胞计数来确定。理想情况下, 应评估有核细胞(TNC)的总数和细胞活率, 但是计算细胞回收率只需要TNC计数。如果使用自动化系统进行细胞计数, 需注意仅计数白细胞(排除红细胞)。

目的细胞的纯度:

起始样本和富集样本中目的细胞的比例(或纯度百分比)可以通过流式细胞仪来确定。细胞分选试剂盒的产品说明书为如何评估该特定细胞的纯度提供了建议。需要注意的是, 一些阳性分选试剂盒可能存在表位占据问题, 因此需要遵循产品说明书的指示, 以确保准确地评估细胞纯度(例如使用特异性抗体克隆, 或在进行细胞分选时, 同时加入染色抗体和分选抗体混合物)。另外, 需要注意对活细胞设门以提高测定细胞纯度的准确性。

从单一样本中分离多种细胞

针对样本有限且需要从中分离多种细胞的情况,可能需要进行依次分选。这避免了将样本分成多份,并确保了目的细胞的高回收率。依次分选是嵌合体分析的理想选择,即通常使用少量血液样本,且需要从单一起始样本分离出多种细胞以进行谱系特定分析。

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,操作流程如下:

- 首先用抗体标记整个样本中需要首先分离的细胞类型,被标记的细胞与磁珠相连,样本被置于磁极中。含有未经标记的细胞的上清液被转移至新的试管中,被标记的目的细胞被保留在磁极中。
- 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类型的抗体进行标记。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试管中,用于最后一步的细胞分离。
- 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细胞类型的组合。STEMCELL Technologies提供用于HLA实验室的各种方案,但该技术也可用于其他许多应用。

依次分选的小窍门

目的细胞的正选必须在未被磁珠标记的细胞群上进行:(a)原始的起始样本,(b)正选中倾倒出来的细胞,(c)使用EasySep™ Release试剂盒正选后磁珠被解离的细胞,或(d)负选中倾倒出来的细胞或富集的细胞群。

我们推荐先分离最稀有的细胞类型(最小化减少细胞损失),最后分离占比最多的细胞类型。若您有关于依次分选的任何问题,请通过info.cn@stemcell.com与我们联系。

依次分选的优势

- 可用于小体积的起始样本
- 最大化细胞的回收率
- 可快速简便的分离多种细胞类型
- 可采用RoboSep™进行自动化的细胞分选,避免交叉污染

如何冻存外周血单个核细胞 (PBMCs)

冷冻保存是一种常用的长期保存细胞的方法,包括从全血或白细胞中分离出来的人外周血单个核细胞 (PBMCs)。冷冻保存PBMCs时,需要将细胞重悬于冷冻保存液中,冷却至极低温度,然后保存在液氮(温度低于-135°C)中。当需要使用细胞时,可解冻冻存的PBMCs,然后用于下游应用,如通过 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),该成分营养丰富,能保护细胞并且有助于细胞在解冻后复苏。然而,使用FBS存在批次间差异以及传播潜在传染性病原体的风险。FBS通常不推荐用于商业化或者临床应用,比如生物制品的生产。二甲亚砜 (DMSO) 是另一种有助于保护细胞不受渗透压裂解的添加剂,也是冻存液中广泛使用的冷冻保护剂。

使用合适的冻存液、细胞浓度和冷冻速度,能确保解冻后PBMCs保持最佳的细胞活率与功能性。以下列出了两种用于成功冻存纯化的PBMCs的方案:

- **使用无血清的冻存液:** CryoStor® CS10 (产品号 #07930),是一种不含血清和动物成分的,含10% DMSO的冻存液。能在冷冻、储存以及解冻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。

实验材料

- 冻存液。可选产品包括:
 - CryoStor® CS10 (产品号 #07930), 或
 - 二甲亚砜 (DMSO) 和胎牛血清 (FBS)
- 冻存管 (如产品号 #38047或#38053)
- 梯度降温盒 (如Nalgene® Mr. Frosty, Sigma Aldrich 产品号 #C1562) 或程序降温仪
- 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)

实验流程

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。

注意: 推荐将PBMCs按 $0.5 - 10 \times 10^6$ cells/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,来确定解冻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,应验证并优化进行冷冻的细胞浓度。

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。
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. 若需长期储存,需将冷冻的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。

注意: 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。

注意: 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 10⁶ cells/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 10⁶ cells/mL。快速转移1 mL的细胞悬液至各冻存管。

注意: 您可以尝试按不同的浓度冻存细胞, 来确定解冻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。

注意: 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. 若需长期储存, 需将冷冻的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。

注意: 推荐在-80°C下进行长期保存。

血液处理实验流程

外周血多形核细胞的制备

从全血分离多形核细胞是研究中性粒细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞和肥大细胞中非常必要的步骤。

以下实验流程描述了如何通过密度梯度离心以及氯化铵裂解红细胞 (RBCs) 的方法从全血中分离多形核细胞。

实验材料

- 含有抗凝剂的全血*
- 离心管 (如Falcon®圆底聚苯乙烯管, 5 mL, [产品号 #38007](#); Falcon®圆底管, 14 mL, [产品号 #38008](#); 或 Falcon®锥形管, 50 mL, [产品号 #38010](#))
- 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](#))
- 氯化铵溶液 ([产品号 #07800](#))

*部分产品只在特定区域可售。若需了解更多信息, 请通过info.cn@stemcell.com与我们联系。

实验流程

1. 在离心管中加入Lymphoprep™。对于不同体积的离心管, 请参考表1中推荐的溶液体积。
2. 使用等量的含2%胎牛血清的磷酸盐缓冲液 (PBS + 2% FBS) 或其他合适的培养基溶液稀释全血。

表1. 不同离心管推荐的溶液体积

Blood (mL)	PBS + 2% FBS (mL)	Lymphoprep™ (mL)	Tube Size (mL)
1	1	1.5	5
5	5	3	14
3	3	3	14
4	4	4	14
5	5	10	50
10	10	15	50
15	15	15	50

3. 将Lymphoprep™加入稀释的血液表面, 注意尽量减少血液与Lymphoprep™的混合。
4. 室温下 (15 - 25°C), 800 x g, 离心20分钟 (离心速度需设置为缓升缓降)。
5. 弃去血浆层、单核细胞层以及Lymphoprep™, 保留全部RBC/粒细胞沉淀。

可选: 此时可将细胞沉淀转移至新的试管中, 以避免试管中遗留的单核细胞的污染。

6. 向细胞沉淀中加入氯化铵溶液, 加满至整个试管。冰上孵育10分钟。
7. 室温下, 500 x g离心10分钟 (离心速度需设置为低速升降)。
8. 弃去上清。加入PBS + 2% FBS重悬细胞沉淀, 接着在室温下, 120 x g离心10分钟 (离心速度需设置为缓升缓降)。
9. 弃去上清。将得到的多形核细胞重悬于合适的溶液中 (如PBS + 2% FBS)。

STEMCELL提供多种[细胞分选试剂盒](#), 用于从全血或多形核细胞群中进行总粒细胞的正选、去除和负选, 以及中性粒细胞、嗜碱性粒细胞和嗜酸性粒细胞的负选。

如何通过密度梯度离心从全血中分离单个核细胞

密度梯度离心法可以利用各种白细胞与密度梯度离心液之间的密度差异, 从外周血、脐带血和骨髓中分离单个核细胞。粒细胞和红细胞的密度比单个核细胞高, 因此在离心过程中会沉淀至密度梯度离心液面下。若要从小周血、脐带血和骨髓中分离单个核细胞, 建议使用密度为1.077g/mL的离心液, 如 [Lymphoprep™](#) 或 [Ficoll®](#)。以下实验流程介绍了如何通过密度梯度离心从全血中分离单个核细胞。

实验材料

- 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®](#) 圆底聚苯乙烯管, 5 mL, [产品号 #38007](#); [Falcon®](#) 圆底管, 14 mL, [产品号 #38008](#); 或 [Falcon®](#) 锥形管, 50 mL, [产品号 #38010](#))

实验流程

实验开始之前:

确保所有试剂都为室温 (15 - 25°C)。

1. 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。
2. 根据产品说明书加入一定体积的密度梯度离心液至一新的试管中。若使用的是 [Lymphoprep™](#), 查看表 2 中推荐的离心液体积和试管大小。

表2. 使用 [Lymphoprep™](#) 进行密度梯度离心的推荐体积和试管大小

Blood (mL)	PBS + 2% FBS (mL)	Lymphoprep™ (mL)	Tube Size (mL)
1	1	1.5	5
5	5	3	14
3	3	3	14
4	4	4	14
5	5	10	50
10	10	15	50
15	15	15	50

3. 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。
4. 400 x g, 离心30分钟, 离心速度设置为缓升缓降。
5. 将移液器枪头直接穿过上层的血浆层, 小心地收集界面间的单个核细胞。或者, 您可以先去上层血浆再收集细胞。
6. 在适当的缓冲液中清洗收集的细胞两次。清洗后的细胞能立即用于下游应用。

如何制备白膜层

白膜层是由来源于全血或骨髓的浓缩的白细胞悬液组成。从全血样本制备白膜层有助于浓缩大体积的样本并且减少下游细胞分选的操作。此外，由于从样本中去除了供体特异的可溶性血清因子，因此使用白膜层可以减少供体的变异性。以下实验流程描述了如何从全血样本制备可用于下游分析或进一步细胞分选白膜层。

实验材料

- 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%胎牛血清的磷酸盐溶液 (PBS + 2% FBS, [产品号 #07905](#))
- 离心管（如Falcon®圆底聚苯乙烯管, 5 mL, [产品号 #38007](#); Falcon®圆底管, 14 mL, [产品号 #38008](#); 或 Falcon®锥形管, 50 mL, [产品号 #38010](#)）

实验流程

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（离心速度需缓升缓降）。
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）。

注意：尽管RosetteSep™和大多数EasySep™ Direct试剂盒已被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：

- 每个有核细胞中至少含100个RBCs。
- 样本中有核细胞的浓度不超过 5×10^7 cells/mL。

如何从存放时间较长的血液样本去除粒细胞

粒细胞的密度会随着血液样本存放的时间而改变。当通过密度梯度离心从存放时间较长的血液样本（收集后存放超过24h）中分选单个核细胞时，可能会有粒细胞的污染。因此可使用Lymphoprep™或Ficoll®，通过密度梯度离心的方法来高效地去除人全外周血样本中的粒细胞。

以下实验流程描述了如何使用RosetteSep™人粒细胞去除抗体混合物通过免疫密度细胞分选的方法来去除粒细胞。此外，我们还提供了另一种实验方案，使用SepMate™离心管通过一次简单的倾倒入收集单个核细胞。在密度梯度离心之前进行免疫密度细胞分选，可使得血液样本中的粒细胞比例小于1%，而若只进行密度梯度离心，血液样本中粒细胞比例大约有20%。

方案一：使用普通离心管进行密度梯度离心

实验材料

- 全血样本（采集后需添加抗凝剂）
- RosetteSep™人粒细胞去除抗体混合物（[产品号 #15624](#)）
- 含有2%胎牛血清的磷酸盐溶液（PBS + 2% FBS，[产品号 #07905](#)）
- Lymphoprep™（[产品号 #07801](#)）
- 离心管（如Falcon®圆底聚苯乙烯管，5 mL，[产品号 #38007](#)；Falcon®圆底管，14 mL，[产品号 #38008](#)；或Falcon®锥形管，50 mL，[产品号 #38010](#)）

实验开始之前

请确保全血样本、RosetteSep™人粒细胞去除抗体混合物、PBS + 2% FBS、Lymphoprep™以及离心机均为室温（15 - 25°C）。

实验流程

1. 每mL全血加入50 μL RosetteSep™人粒细胞去除抗体混合物，室温下孵育20分钟。
2. 加入等体积的PBS + 2% FBS稀释全血，轻轻混合。
3. 将稀释后的样本加到Lymphoprep™液面上。请注意，尽量避免密度梯度离心液与样本混合。
4. 室温下，1200 x g，离心20分钟（离心速度需缓升缓降）。
5. 从Lymphoprep™和血浆之间的界面收集富集的细胞。

6. 使用PBS + 2% FBS清洗收集的细胞。

7. 重复清洗步骤。

方案二：使用SepMate™管进行密度梯度离心

实验材料

- 全血样本（采集后需添加抗凝剂）
- RosetteSep™人粒细胞去除抗体混合物（[产品号 #15624](#)）
- 含有2%胎牛血清（FBS）的磷酸盐溶液（PBS + 2% FBS，[产品号 #07905](#)）
- Lymphoprep™（[产品号 #07801](#)）
- SepMate™-15（[产品号 #85415](#)）或SepMate™-50（[产品号 #85450](#)）

实验开始之前

请确保全血样本、RosetteSep™人粒细胞去除抗体混合物、PBS + 2% FBS、Lymphoprep™以及离心机均为室温（15 - 25°C）。

实验流程

1. 每mL全血加入50 μL RosetteSep™人粒细胞去除抗体混合物，室温下孵育10分钟。
2. 加入等体积的PBS + 2% FBS稀释全血，轻轻混合。
3. 将Lymphoprep™通过SepMate™管中的孔加入到插件中。
4. 沿着SepMate™管的管壁，将稀释的样本加入。
5. 室温下，1200 x g，离心20分钟（离心速度无需缓升缓降）。
6. 将包含单个核细胞的上层溶液快速倾倒至一个新的试管中。切勿倒置SepMate™管超过2s。
7. 使用PBS + 2% FBS清洗收集的细胞。
8. 重复清洗步骤。

注意：为了最大化减少血小板污染，可在收集细胞之前去除掉血浆液面上层的三分之一。或者在步骤8之后，通过120 x g，室温下离心10分钟（离心速度需缓升缓降）来去除血小板。

组织处理实验流程

组织解离方法指南

种属	组织类型	相关技术资源	产品号 #
小鼠	骨	EasySep™小鼠间充质干/祖细胞富集试剂盒产品说明书 (请参阅Sample Preparation)	19771
小鼠	中枢神经系统组织	技术手册 (请参阅Section 4 "Procedure for NeuroCult™ Enzymatic Dissociation of Adult Mouse and Rat CNS Tissue") 注意: 如需要小鼠CD11b小胶质细胞的解离步骤, 请联系info.cn@stemcell.com	05715
小鼠	小肠隐窝	IntestiCult™类器官生长培养基 (小鼠) 进行肠上皮类器官培养 (请参阅操作步骤Section 1: Isolation of Mouse Intestinal Crypts)	06005
小鼠	肺	EasySep™小鼠ILC2富集试剂盒产品说明书 (请参阅Sample Preparation "LUNG TISSUE")	19842
小鼠	乳腺	温和的胶原酶/透明质酸酶	07919
小鼠	脾脏	酶解法 - 脾脏解离试剂产品说明书 (请参阅Handling/Directions for Use) 注意: 酶解法只推荐用于使用EasySep™分选CD11c细胞前的样本处理	07915
人	小肠隐窝	IntestiCult™类器官生长培养基 (人) 产品说明书 (请参阅Directions for use A. "ISOLATION OF HUMAN COLONIC CRYPTS FROM BIOPSIES")	06010
人	乳腺	胶原酶/透明质酸酶产品说明书	07912
人	脾脏或淋巴结	EasySep™ Direct HLA T细胞分选试剂盒产品说明书 (请参阅Sample preparation "SPLEEN or LYMPH NODE")	19671

制备单细胞悬液

如何减少单细胞悬液中的细胞团块

制备单细胞悬液是细胞分选成功的关键, 但是如果您的样本有细胞团块, 可能会导致较低的回收率并且干扰对目的细胞的标记。当样本被反复冻融或者在经过酶分解后, 有时会出现细胞团块。这些细胞团块的产生是因为环境压力可以加速样本内细胞的死亡, 导致从即将凋亡的细胞中释放出可以将周围细胞粘在一起的"粘性"DNA分子。本实验流程描述了如何使用DNase I处理您的样本以减少单细胞悬液中的细胞团块。

实验材料

- DNase I溶液 (1 mg/mL, [产品号 #07900](#))
- 培养基溶液或不含EDTA的缓冲液 (如改良版HBSS (不含Ca⁺⁺和Mg⁺⁺), [产品号 #37250](#), 或者磷酸盐溶液 (PBS))
- 胎牛血清 (FBS)
- 两个50 mL锥形管 (如Falcon®锥形管, 50 mL, [产品号 #38010](#))
- 细胞过滤器 (如70 μm倒置过滤器, 大号, [产品号 #27260](#))
- 含2% FBS的PBS (如含2%胎牛血清的Dulbecco's磷酸盐溶液, [产品号 #07905](#))
- 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](#))

实验流程

注意: 如果您下游需要提取DNA或RNA, 则不能使用DNase I减少细胞团块。

1. 在37°C水浴锅中快速旋转冻存管以解冻细胞。将解冻的细胞转移至灭菌的50 mL锥形管中。

可选: 先使用移液器在锥形管中加入0.25到0.5 mL DNase I溶液, 再将解冻的细胞转移至管中。

2. 缓慢逐滴加入10 - 15 mL的含10% FBS的培养基或缓冲液, 同时轻轻转动试管。

3. 用1 mL含10% FBS的培养基或缓冲液 (例如PBS或者HBSS) 冲洗冻存管, 以收集管中残留的细胞, 然后将培养基或缓冲液转移到新的试管中。
4. 用含10% FBS的培养基或缓冲液补满50 mL试管。轻轻倒置混匀。
5. 室温下 (15 - 25°C), 300 x g, 离心10分钟后收集细胞。
6. 小心地弃去尽可能多的上清液, 尽量不要搅动细胞沉淀。轻轻敲打管壁来重新悬浮沉淀。
7. 如果细胞看上去成团块状, 计算需要加入样本的DNase I达到终浓度为100 μg/mL所需的体积, 逐滴加入DNase I并同时轻轻转动试管混匀。在室温下孵育15分钟。
8. 加入25 mL含2% FBS的培养基或缓冲液清洗细胞。轻轻倒置试管混匀然后离心 (室温下, 300 x g, 10分钟)。弃去尽可能多的上清液, 然后重新温和地重悬沉淀。
9. 如果细胞看上去仍然成团块状, 使用一个37 - 70 μm的细胞滤网过滤样本并移入新的锥形管中。使用含2% FBS的培养基或缓冲液洗涤试管, 然后使用细胞滤网过滤, 重复三次。
10. 得到的单细胞悬液可以立即进行细胞计数和进一步的下游应用, 例如细胞分选。

注意: 如果是对DNase I比较敏感的下游应用 (例如造血细胞集落检测), 进行细胞计数前再使用适当的检测缓冲液洗涤 (不含DNase I) 细胞一次。

如何从小鼠脾脏制备单细胞悬液

以下实验流程描述了如何从脾脏样本收集细胞以及如何在进行细胞分选之前制备单细胞悬液。从原代组织样本中制备单细胞悬液可避免过量的细胞损失并且能够最大化标记靶细胞,从而优化细胞分选。

实验材料

- 35 mm培养皿 ([产品号 #27100](#))
- 根据您使用的细胞分选试剂盒的产品说明书推荐的解离试剂,包括:
 - EasySep™ 缓冲液 ([产品号 #20144](#))
 - RoboSep™ 缓冲液 ([产品号 #20104](#))
- 3 cc注射器 ([产品号 #28230](#))
- 50 mL锥形管 (如Falcon®锥形管, 50 mL, [产品号 #38010](#))
- 70 μm细胞过滤器 (如70 μm倒置过滤器, 大号, [产品号 #27260](#))
- 5 mL或10 mL无菌移液管 (如Falcon®无菌移液管, 5 mL, [产品号 #38003](#)或Falcon®无菌移液管, 10 mL, [产品号 #38004](#))

实验流程

第一部分: 脾脏样本的机械解离

1. 将待处理的脾脏转移至含有5 mL推荐解离试剂 (请参阅您细胞分选试剂盒的[产品说明书](#))的35 mm无菌培养皿中。若您在解离后不进行细胞分选,可使用磷酸盐溶液 (PBS) + 1 mM EDTA。

注意: 如果需要处理多个脾脏,请使用含有10 mL推荐解离试剂的100 mm的无菌培养皿 ([产品号 #38045](#))。

2. 去除脾脏组织上任何多余的结缔组织或脂肪,注意坏死区域,并检查脾脏是否有其他症状,如肿大、变色或病变。值得注意的是,记录起始样本的状态对于后期评估细胞非常重要。

3. 从3 cc无菌注射器中取出活塞/柱塞。使用扁平的末端部分以温和画圆的方式研磨脾脏5次。这样可以破坏脾脏和髓质,释放脾细胞。

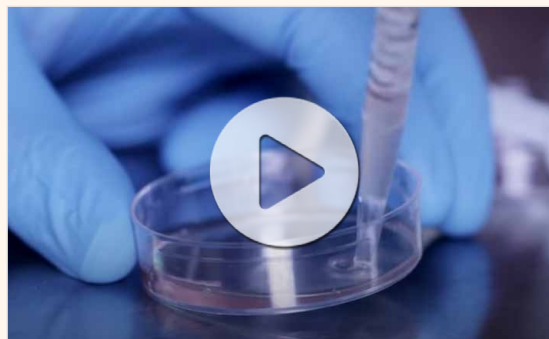
注意: 润洗滤网可以减少由于滤网干燥而引起的细胞黏附于滤网的情况。

第二部分: 单细胞悬液的制备

1. 将一个70 μm细胞过滤器置于50 mL无菌锥形管上,并用2 mL推荐试剂润洗滤网。
2. 使用润洗过的5 mL或10 mL无菌移液管将脾细胞吹打均匀。
3. 将上清液和组织从培养皿转移至润洗过的细胞过滤器上。使用一个新的3 cc无菌注射器的活塞/柱塞,以温和画圆的方式使细胞和组织通过滤网。
4. 用3 mL推荐试剂冲洗滤网。重复此步骤,并弃去残留的组织 and 滤网。
5. 使用PBS补足含有细胞悬液的试管。300 x g, 离心10分钟。
6. 小心弃去上清液,注意不要搅动细胞沉淀。
7. 轻轻敲打试管以重悬细胞。如有需要,可进行第二次清洗。得到的脾细胞可用于下游应用。

欲了解更多的实验流程和技术窍门, 请浏览以下链接查看我们的实验方法库: www.stemcell.com/technical-resources/methods-library/cell-separation.html

若您有关于这些实验流程或技术窍门的任何问题, 请随时通过info.cn@stemcell.com与我们的技术人员联系。



如何从小鼠脾脏制备单细胞悬液?



热门产品

查看以下精选产品列表，以用于您的细胞分选和分析实验。欲了解用于您免疫学研究的完整产品列表，请访问 www.stemcell.com。

实验耗材

产品	产品号 #
Falcon®圆底聚苯乙烯管, 5 mL	38007
Falcon®圆底管, 14 mL	38008
Falcon®锥形管, 50 mL	38010
35 mm培养皿	27100
70 µm细胞过滤器	27260

用于组织解离的酶

产品	产品号 #
I型胶原蛋白酶	07902
胶原酶/透明质酸酶 (10X)	07912
DNase I (1 mg/mL)	07900
脾脏解离液	07915
胰蛋白酶-EDTA (0.05%)	07910

抗体

产品	产品号 #
抗人CD4抗体, 克隆号 SK3	60122PE
抗人CD8a抗体, 克隆号 SK1	60125PE
抗鼠CD25抗体, 克隆号 PC61.5	60009
抗鼠CD138 (Syndecan-1) 抗体, 克隆号 281-2	60035
抗鼠CD19抗体, 克隆号 1D3	60112

细胞分选及去除产品

产品	产品号 #
EasySep™ T细胞分选试剂盒	17951 (人) 19851 (小鼠)
EasySep™ B细胞分选试剂盒	17954 (人) 19854 (小鼠)
EasySep™ NK细胞分选试剂盒	17955 (人) 19855 (小鼠)
EasySep™ 单核细胞分选试剂盒	19359 (人) 19861 (小鼠)
EasySep™ Pan-ILC富集试剂盒	17975 (人) 19875 (小鼠)
EasySep™ Direct人PBMC分选试剂盒	19654
EasySep™ 死细胞去除 (Annexin V) 试剂盒	17899
EasySep™ RBC去除试剂	18170
SepMate™-15	85415 (100根管) 85420 (500根管)
SepMate™-50	86415 (100根管) 86420 (500根管)

密度梯度离心液、缓冲液和其他试剂

产品	产品号 #
Lymphoprep™	07801
HetaSep™	07806 07906
含2%胎牛血清的磷酸盐溶液 (PBS + 2% FBS)	07905
氯化铵裂解液	07800

参考文献

1. Colter DC et al. (2000) Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(7):3213–8.
2. Dalili A et al. (2018) A review of sorting, separation and isolation of cells and microbeads for biomedical applications: microfluidic approaches. *Analyst* 144(1):87–113.
3. Guo KT et al. (2009) A new technique for the isolation and surface immobilization of mesenchymal stem cells from whole bone marrow using high-specific DNA aptamers. *Stem Cells* 24(10):2220–31.
4. Gross A et al. (2015) Technologies for single cell isolation. *Int J Mol Sci* 16(8): 16897–919.

版权所有©STEMCELL Technologies Inc. 2021。保留一切权利, 包括图形和图像。STEMCELL Technologies和其设计及徽标, 以及Scientists Helping Scientists、EasySep、RoboSep、SepMate、HetaSep、NeuroCult、IntestiCult、ErythroClear和RosetteSep均是STEMCELL Technologies Canada Inc.的注册商标。Lymphoprep和OptiPrep是Alere Technologies的注册商标。Ficoll-Paque是GE HealthCare Ltd.的注册商标。CryoStor是BioLife Solutions Inc.的注册商标。Falcon、Lambda和Corning是Corning Incorporated的注册商标。其他注册商标为各自持有人的产权。STEMCELL尽力确保STEMCELL及其供应商提供的信息正确无误, 对此类信息的准确性或完整性不作任何保证或声明。

产品仅供研究使用。除非另行说明, 不可用于人或动物的诊断或治疗。有关STEMCELL质量控制的更多信息, 请参阅WWW.STEMCELL.COM/COMPLIANCE。