

# 新鲜细胞使用说明书

新鲜细胞是新鲜采集的单采血用密度梯度离心的方法分离得到的，采用2-8℃恒温运输的方式进行运送，保证离体时间，最大限度的保持细胞活力。

**实验设备：**生物安全柜、微量移液器、离心机

**试剂耗材：**吸管若干，蓝枪头，不含钙镁的磷酸盐缓冲液（DPBS），含有10%血清的 DPBS（血清可以替换成 0.5%BSA/HSA）

**实验步骤：**

1 取出装有细胞的离心管，轻轻上下颠倒混匀（若担心离心后计数不准确，可以在此步骤中用移液管混匀后取少部分液体计数对比）。

2 将离心管放入离心机，离心机设置 400g 10min 离心前，一定配平！。

5 小心弃掉上清液，缓慢加入含有 10%血清的 DPBS 1~2mL，缓慢吹散细胞，根据不同的细胞规格补一定量的含有 10%血清的 DPBS，混匀。

6 取 100μl 细胞加入 900μL 的含有 10%血清的 DPBS 混匀（具体稀释比例可参考不同细胞计数仪的置信区间浓度），吸取 12μL 稀释过的细胞与 12μL 的 AO/PI 染色液混匀后，上机计数。

**注意事项：**

1 含有 10%血清的 DPBS 可以用完全培养基代替。

2 拿到细胞后须尽快使用，若需要一定时间准备，请先将细胞放在 4℃冰箱内暂存。

3 离心时，避免转数过大或时间过长对细胞产生损伤，同时也不利于重悬细胞。可根据细胞用途调整离心转速，但转速较低，离心时间较短可能会造成细胞损失。

4 由于不同细胞计数仪置信区间不同，建议将细胞浓度稀释至  $1E+06 \sim 5E+06/ml$  进行计数。