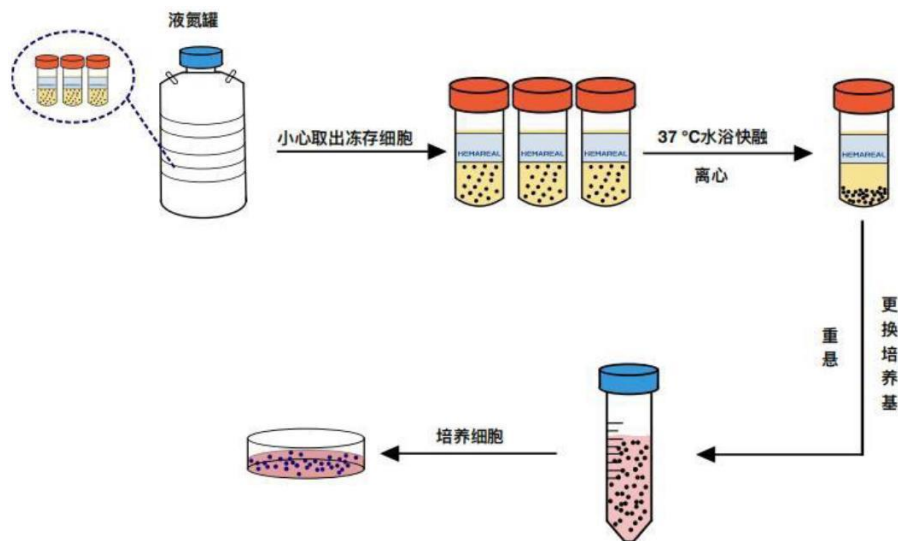


PBMC 复苏操作说明书

PBMC (peripheral blood mononuclear cell), 外周血单个核细胞, 顾名思义, 其主要细胞类型为血液里边具有单个核的细胞, 主要包括淋巴细胞 (T/B/NK), 单核细胞, 树突状细胞和其他少量细胞类型, 其中淋巴细胞占很大一部分。PBMC 冻存细胞产品已经去除了红细胞和多核细胞, 并且经过严格的质量检测, 保证不含 HIV, HBV, HCV, TP 等传染性病毒, 细菌, 真菌和支原体检测阴性, 保证生物安全。

PBMC 细胞复苏的 3 个要点: 快速融化, 避免染菌, 操作轻柔。



实验准备

试剂: 缓冲液: PBS 或 DPBS (含 0.5%BSA/FBS); 培养基; 台盼蓝; 其他: 75%酒精,

耗材: 巴氏吸管, 15mL 离心管, 50mL 离心管, 血细胞计数板, 微量移液枪, 移液枪头, 止血钳, 一次性手套; 其他: 止血钳/镊子

仪器设备: 水浴锅, 水平离心机, 显微镜, 生物安全柜。

操作步骤

1. 水浴锅预热：实验之前 30min 前开启水浴锅，设置温度到 37 °C，将培养基，缓冲液提前预热，保证复苏细胞时水浴锅已达到 37 °C。
2. 从液氮罐或干冰运输箱中取出冻存管，用止血钳或镊子夹紧管盖边缘，将冻存管有细胞的部分浸到水面以下，缓慢搅动，尽量保证管盖不没入水中，避免染菌。解冻时间参考下列表格，不要过早把细胞从水浴锅中拿出。解冻时间一定不要过长，可以允许有极小的未溶解冰晶漂浮在冻存管中，解冻过长会影响细胞活性。

规格	10M	50M	100M
解冻时间	1min 50s	1min 50s	2min 10s

水浴时间参考（根据设备、环境等因素，适当调整水浴时间）

3. 用 75%酒精喷洒冻存管表面，用无菌纸擦拭冻存管，转移到生物安全柜中。取出预热后的缓冲液用 75%酒精喷洒冻存管表面，转移到生物安全柜中。
4. 取一支 15ml 离心管，加入约 9ml 缓冲液，用巴氏吸管将冻存细胞液缓慢转移至装有缓冲液的离心管内。再吸 1ml 缓冲液润洗冻存管，然后合并到 15ml 离心管内。（吹打过程中注意轻柔缓慢。也可以将巴氏吸管更换为 1ml 枪头/5ml 移液管。）
5. 将离心管配平，然后离心。离心参数为 300g-400g，5-10min。离心结束后，弃去上清液，加入缓冲液或基础培养基，调整细胞密度并取样计数。

规格	10M	50M	100M
推荐用离心管容量	15mL	15mL	50mL
重悬液体总量	2mL	10mL	20mL

6. 根据计数结果再次离心，替换培养基；或加入培养基调整细胞密度至实验条件。