



上海中医药大学科技实验中心送检样品要求与制备 SOP

肝脏、肝脏和肿瘤组织单细胞悬液样品要求与制备

【样品名称】肝脏、肝脏和肿瘤组织单细胞悬液制备方法

【检测技术】流式细胞术

【科 室】病毒免疫实验室

【联系人】杨以阜 咨询电话：51322438 电子邮件：celiazx87@126.com

【检测样品要求与制备方法】

1. 颈椎脱臼处死小鼠，分离需要制备单细胞悬液的脏器。
2. 将脏器剪碎后加入 IV 型胶原酶(collagenase IV)在 37℃ 条件下消化。
3. 取一干净平皿，放入钢网，将脏器置于钢网上，加入适量 PBS 或者培养基。用研磨棒轻轻研磨脏器，尽量将所有脏器组织研磨成单细胞状态，直到只剩下脏器的结缔组织为止。
4. 弃去钢网和钢网上的结缔组织，收集平皿内的细胞悬液，离心沉淀。
5. 红细胞裂解液裂解红细胞，离心去除红细胞碎片。
6. 用 PBS 重悬沉淀，就可以标记荧光素偶联抗体，然后流式上样分析。

【注意事项】

1. IV 型胶原酶消化脏器的最佳时间各不相同:肝脏组织较脆，结缔组织含量相对较少，一般消化 0.5~1h;肝脏组织较韧，完全消化大约需 3h;肿瘤组织根据组织类型的不同而异，一般需 1~2h。
2. 注意研磨时动作应轻柔，用力过大可导致细胞死亡。
3. 不同荧光素有其特定的激发光和发射光，流式分析时需选择发射不同波长荧光的荧光素，使他们之间的信号采集和分析不会互相干扰。
4. 样本浓度要求：建议 $10^5\sim10^6/ml$ 。
5. 流式检测要求样品新鲜，液氮冷冻保存或者固定处理后的样品都不能用于流式检测分析。