

Leukopak计数说明书

Leukopak是通过血细胞分离机利用白细胞分离术，从正常人供体外周血中富集的产物。

Leukopak由多种组分组成，主要包括单核细胞、淋巴细胞、血小板、红细胞等。与标准的静脉穿刺收集方法或血沉棕黄层产物相比，含有更高浓度的白细胞。

● 所需材料

- ✓ Leukopak
- ✓ 缓冲液：不含钙或镁离子的PBS (DPBS)、0.5%
人血清白蛋白 (HSA)、2mM EDTA
- ✓ 75%乙醇
- ✓ 3mL巴氏吸管和10mL, 25mL移液管
- ✓ 50mL无菌离心管
- ✓ 大型无菌容器 (用于盛放Leukopak)

● 所需设备

- ✓ 生物安全柜 (BSC)
- ✓ 微量移液器

【注】 使用人源的生物材料和液氮时，请始终穿戴个人防护设备并采取必要防护措施。

实验方法：

1. 预从恒温运输箱中取出Leukopak采集袋，75%的酒精溶液喷洒其外包装后，转移至生物安全柜 (BSC)。
2. 将Leukopak轻轻上下颠倒混匀，开封后倒入一个大型无菌容器 (若总体积<50mL，可以转移至50mL离心管中)。
3. 无菌巴氏吸管取3-5mL缓冲液清洗采集袋，重复此操作2-3次，将上述缓冲液转移至步骤2中的无菌容器中，并混匀。

4. 取步骤3中0.05mL的 Leukopak悬液，将其加入0.95mL的4°C冰浴的缓冲液中，颠倒混匀，并用1ml移液器吹打均匀。
5. 准备低吸附的一次性无菌PE手套铺平，加入20μl AO/PI染料，取20μl细胞悬液加入染料中混匀，轻缓均匀吹打10次左右，取混合液体20μl加入细胞计数板，插入细胞计数仪上读取细胞浓度，5min内读完。
6. 重复步骤5两次，稀释后细胞浓度取三次计数结果平均值，计算Leukopak细胞总数。

Leukopak细胞总数=计数结果平均值*体积*20倍

操作过程注意事项：

1. 操作过程必须是无菌操作，建议实验人员穿实验服，戴手套，护目镜和口罩；
2. 步骤4中2-3次清洗采集袋，目的是尽量将全部细胞回收，减少细胞损失。

【注】 省略此步会导致细胞得率大幅降低
3. 确保样本混匀；
4. 染料与细胞混匀的容器必须为低吸附耗材；
5. 细胞稀释原则为先加稀释液，再加细胞液，操作过程需润洗枪头，避免细胞丢失造成细胞计数偏差；
6. 计数的方法不推荐用台盼蓝染色法，Leukopak为含白细胞及红细胞血小板的混合液体，该方法无法区分白细胞与其他细胞；
7. 推荐稀释倍数20×，稀释后细胞浓度范围通常在 $2-6 \times 10^6$ cells/ml范围，浓度过高与过低均会使得计数结果偏差较大。

【注】 Leukopak密度梯度离心操作步骤请参考“Leukopak密度梯度离心操作说明书”