

PBMC复苏说明书

外周血单个核细胞 (Peripheral Blood Mono-nuclear Cell, PBMC) 是外周血中具有单个核的细胞, 包括淋巴细胞、单核细胞和树突状细胞等。这些细胞是免疫系统的重要组成部分, 参与体液免疫和细胞介导免疫。外周血单个核细胞在微生物学、病理学、肿瘤学、疫苗研发、器官移植以及再生生物学等研究和临床上被广泛使用。外周血单个核细胞通过密度梯度离心纯化, 可采用新鲜或低温保存的形式。

深低温保存与正确地复苏PBMC的操作方式是保证细胞功能与活力的关键, 请采用正确快速的操作手法以确保细胞有更高的存活率。

● 试剂耗材

缓冲液: PBS或DPBS、0.5% HSA或FBS (比例视需求可调整)

其他: 75% 酒精、15ml离心管、50ml离心管、巴氏滴管、止血钳、一次性无菌薄膜PE手套

● 设备

恒温水浴锅、生物安全柜、液氮罐、微量移液器、离心机

● 操作步骤

1. 预先在37°C恒温环境中(如, 水浴锅, 恒温箱等)预热缓冲液和培养基。
2. 从液氮罐中快速取出冻存管, 请使用**止血钳固定住冻存管帽**, 在37°水浴中缓慢摇晃。

【注】 尽量保证冻存液的液面在水面以下, 且为防止污染, 水面**不能接触冻存管盖**。

3. 根据冻存管规格大小, 请选择合适的解冻时间。下表所示**仅供参考** (解冻时间与水浴锅实际温度、晃动频率、室温相关)。

妙顺(上海)生物科技有限公司

地址: 中国 | 上海 | 浦东新区盛夏路169号A栋711室 | 邮箱: techserv@miles-bio.com

电话: 86-21-64169736 网站: www.miles-bio.com

【解冻标准】有且只有一点冰晶（冰晶不能残留过多，会严重影响活率，但切勿解冻时间过长）。

规格	10M	25M	50M	100M
冻存体积	500μl	1.25ml	2.5ml	5ml
解冻时间	2 min	2 min 10 s	2 min 50 s	3 min 10 s

- 当冻存管内还保留少量冰晶时将冻存管从水浴锅中取出，用75%的酒精进行消毒，无菌纸擦拭，迅速转移至生物安全柜中。
- 提前将6-8ml预热的缓冲液加入无菌15ml离心管中，用少量缓冲液稀释冻存管中细胞并将其转移至15ml离心管，请润洗枪头和冻存管2-3次减少细胞损失。操作过程中请动作轻缓减少机械损伤，且不接触管口避免污染。
- 将5中15ml离心管中缓冲液体积补至14ml，混匀，取一部分细胞进行细胞计数与活力检测。
- 将6中15ml离心管进行室温条件下离心400g、10min（详细离心参数见下表，可依据离心管类型、实验需求进行调整优化）。

* 推荐离心条件：

细胞规格	10M	25M	50M	100M
离心管推荐	15ml	15ml	15ml	50ml
Buffer加样量	14ml	14ml	14ml	45ml
离心转数/时间	400g 10min	400g 10min	400g 10min	400g 10min
定容体积	2ml	5ml	10ml	20ml
浓度范围	5-7×10 ⁶ cells/ml			

【注】不同实验室可根据细胞用途适当调整离心力或时间，如用作培养，可推荐15ml离心管 300g 10min，

妙顺（上海）生物科技有限公司

地址：中国 | 上海 | 浦东新区盛夏路169号A栋711室 | 邮箱：techserv@miles-bio.com

电话：86-21-64169736 网站：www.miles-bio.com

注意会微损失细胞数量。不可用5min时间，损失严重（PBMC细胞较小）。

8. 使用巴氏吸管吸弃上清，待离心管中剩余1-2ml上清时，改用移液枪吸弃（无菌操作，避免吸到细胞）。
 9. 加入1-2ml 缓冲液，**轻缓吹散**细胞，再加入适量缓冲液，定容至所需体积。（一次性加较多缓冲液可能会吹打不匀或成团较多，故选择分次加液）
 10. 取适量细胞进行**细胞计数**与活力检测。
- 【注】**使用低吸附材质的容器，推荐用**一次性无菌薄膜手套**，先**取染液**，再取等体积细胞悬液混匀，取样计数。
11. 根据实验需求将细胞悬液转移到适当的培养皿或者培养瓶中，以待进一步使用。

- **培养基请参考下表，不同实验所需添加因子有差异，请依据实验需求调整培养方案。**

Cell Type	Media	Cytokine
Mononuclear cells	RPMI* AIMV	
CD3 ⁺ Pan T cells	RPMI* AIMV	IL-2
CD4 ⁺ T cells	RPMI* AIMV	IL-2
CD8 ⁺ T cells	RPMI* AIMV	IL-2
CD19 ⁺ B cells	DMEM RPMI* α -MEM X-VIVO	
NK cells	DMEM RPMI* SCGM Medium	IL-2 IL-15
Neutrophils	RPMI 1640 (supplemented)	G-CSF GM-CSF
CD34 ⁺ stem/progenitor cells	RPMI 1640 (supplemented)	SCF IL-3 IL-6
CD14 ⁺ Monocytes	DMEM RPMI*	GM-CSF (M1 MØ) M-CSF (M1 MØ) IL-4 + GM-CSF (dendritic cells)
Dendritic cells	RPMI*	IL-4 GM-CSF

妙顺（上海）生物科技有限公司

地址：中国 | 上海 | 浦东新区盛夏路169号A栋711室 | 邮箱：techserv@miles-bio.com

电话：86-21-64169736 网站：www.miles-bio.com