

骨髓细胞染色体制备- 2次低渗处理

一、试剂&耗材

1. 低渗液
75mM 氯化钾低渗液。
2. 固定液
甲醇和醋酸按3：1配制固定液，现配现用。
3. 秋水仙素/胺
秋水仙素，10 μ g/mL。
4. 洁净载玻片
染色体制备用免洗载玻片。
5. 细胞培养液
骨髓细胞培养液（RPMI1640 + 20% FBS）

二、2次低渗处理方法

低渗次	细胞悬液留量	培养液占比	低渗液加液量	低渗液占比	总体积mL
1	2mL	33.3%	4mL	66.7%	6mL
2	2mL	11.1%	4mL	88.9%	6mL

参考AGT骨髓细胞收获方法，10mL 培养体系，低渗处理时低渗液的添加量一般为10mL。低渗液占比与上述第二次低渗处理时的低渗液占比相当。

暂时没有找到2次低渗处理的骨髓细胞收获方法，无直接可以参考的方法。

三、骨髓细胞收获方法

1. 加入100 μ L 秋水仙素溶液⁵（终浓度：0.2 μ g/mL），培养1~2 h；
2. 离心10 min（1000 rpm）；
3. 吸除上清液，保留细胞层（2 mL），
4. 加入4mL 低渗液，充分且适当混匀细胞，低渗处理 0~2 min¹； **【第1次低渗处理】**
5. 离心10 min（1000 rpm）；
6. 吸除上清液，保留细胞层（2 mL）；
7. 加入4mL 低渗液，充分且适当混匀细胞，低渗处理 10~30 min²； **【第2次低渗处理】**
8. 加入0.5~0.6mL 固定液，充分混悬细胞,室温处理约0~5 min³； **【预固定处理】**
9. 离心10 min（1000 rpm）；
10. 吸除上清液，保留细胞层（约1~1.5 mL）；

11. 加入5 mL 固定液,充分混悬细胞,室温处理约0~5 min ;

【第1次固定处理】

12. 重复9、10、11步操作(2次);

【重复固定处理2次】

13. 视管底细胞量加入适当量的固定液,混匀制成细胞悬液;

推荐:滴片前将固定好的细胞悬液在室温下保持30min;

注:

1. 第1次低渗处理时间尽量缩短,降低在第2次加低渗液混匀时对细胞可以产生的损伤,影响最终收获的细胞量。振荡速度和时间考虑是否要降低?
2. 第2次低渗时间可以与常规的低渗处理时间做对照。
3. 经2次低渗处理的细胞,预固定时,可能要优化振荡速度和时间。

四、2次低渗处理的考量因素

1. 低渗处理是否完全;
2. 是否可以降低第2次低渗处理的时间,以提高收获效率;
AGT参考低渗处理时间:28min,20min,15~20min。
3. 染色体分散质量是否受2次低渗处理的影响;
4. 低渗液单次添加量降低,是否可以降低预固定的振荡速度和时间?