

# UrinEasy 尿液细胞分离培养试剂盒说明书

V4.1 版本，更新日期：2018 年 5 月 10 日

货号：CA3102500

规格：1 Kit

## 储存条件：

UrinEasy 尿液细胞分离培养洗涤液 2 ~ 8℃；UrinEasy 尿液细胞分离培养缓冲液（50x）2 ~ 8℃；UrinEasy 尿液细胞分离培养基础培养基 2 ~ 8℃，UrinEasy 尿液细胞分离培养添加剂-20℃，混匀后 2 ~ 8℃，1 个月内使用完毕。

## 产品简介：

UrinEasy 尿液细胞分离试剂盒是由赛贝生物（Cellapy）开发的一种用于尿液细胞分离的试剂盒。本试剂盒操作简便，可重复性强。获得的细胞类型大部分为肾上皮细胞，增殖快速，自我更新能力强，配合 UrinEasy 尿液细胞扩增试剂盒可在短时间内收获大量细胞。

## 产品内容：

组分代码	名称	规格	数量
CA3102500-1	UrinEasy 尿液细胞分离培养基础培养基	50mL	1 瓶
CA3102500-2	UrinEasy 尿液细胞分离培养添加剂	5mL	1 瓶
CA3102500-3	UrinEasy 尿液细胞分离培养缓冲液（50x）	10mL	1 瓶
CA3102500-4	UrinEasy 尿液细胞分离培养洗涤液	100mL	1 瓶

## 试剂准备：

- UrinEasy尿液细胞分离培养完全培养基（以下简称：UrinEasy分离完全培养基）：

在2 ~ 8℃解冻UrinEasy尿液细胞分离培养添加剂，吹打混匀，随后将添加剂加入UrinEasy基础培养基形成UrinEasy分离完全培养基（每0.5mL添加剂与5mL基础培养基混合）。UrinEasy分离完全培养基可在2 ~ 8℃稳定储存1个月。

**注：**添加剂在2 ~ 8℃解冻，可按实际用量对添加剂进行分装，分装后重新置于-20℃保存，避免反复冻融。

- **UrinEasy尿液细胞分离培养缓冲工作液：**

将UrinEasy尿液细胞分离培养缓冲液（50x）与细胞培养级用水按1:50配制成工作液。

## 尿液细胞分离操作流程

### 尿液采集：

1. 采样者排出晨尿后，大量饮水，尽量排出 200mL 以上尿液。

**注：**晨尿含有大量杂质，需排出以便采集新鲜尿液。

**注：**幼儿尿液量少，无法达到 200mL，收集尿液细胞的操作需尽量避免丢失细胞。

2. 使用医用消毒湿巾清洁尿道口。

3. 用 500mL 无菌取尿瓶采集中段尿，采集结束后立即密封瓶口，并用 PARAFILM 封口。

**注：**整个尿液采集过程中佩戴无菌医用检查手套，清洗尿道口后不可再接触尿道口，避免染菌。

4. 转入无菌操作间中，进行尿液细胞的分离操作。如果在一小时之内不操作，可加入等体积 UrinEasy 尿液细胞分离培养缓冲工作液混匀，用 PARAFILM 封口后 2 ~ 8℃ 储存，储存时间建议不超过 4h。

### 尿液细胞的分离：

1. UrinEasy 分离完全培养基在使用前取出并平衡至室温，取出包被过 Matrix 的 12 孔板，

吸去包被液并每孔加入 750  $\mu$ L UrinEasy 分离完全培养基（100-250mL 尿液推荐：若为男性准备 1 孔，若为女性准备 2 孔，因为女性杂细胞较多），置于 37°C 恒温 CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中。

2. 用 75% 酒精消毒尿瓶外表面，转移至无菌操作台中。用移液管将尿液分装至 50mL 锥形底离心管中，200g 离心 5min。
3. 将电动移液器吸液速度调至最小，用移液管沿上液面缓慢吸取上清，每管保留约 1mL，其余弃除。

**注：**弃除上清的操作极易损失细胞，需严格按照说明书操作，避免离心管底部液体受到振动。

4. 加入 10mL UrinEasy 尿液细胞分离培养洗涤液重悬细胞，转移合并到一支 15mL 锥形底离心管中（若剩余悬液较多，也可合并至 50ml 离心管内），200g 离心 5min。
5. 弃上清，用已经加入到 12 孔板内的 UrinEasy 分离完全培养基重悬细胞，并接种。记为 D0（第 0 天）。
6. 水平十字摇匀，37°C 恒温 CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养。
7. 24h 后，观察细胞有无污染，记为 D1（第 1 天）。
8. D2（第 2 天），观察细胞有无污染、有无贴壁细胞。可每孔适当补充 250  $\mu$ L-500  $\mu$ L 尿液分离完全培养基（女性尿液杂细胞较多，可以补 500  $\mu$ L）。
9. D3（第 3 天）开始每日观察有无细胞贴壁，由于女性鳞状上皮细胞较多会影响观察，如有细胞贴壁，可在 4~5 天半量换液，第一次吸出的半量废液加入到另一个包被的孔中，观察是否有细胞。之后每两天换液，小心沿壁加入 1mL 新鲜的尿液分离完全培养基，避免吹起皿底贴附的细胞。
10. 镜下观察有细胞贴壁时，可将培养基由 UrinEasy 分离完全培养基换为 UrinEasy 扩增完全培养基。

**注：**尿液细胞约在 3~7 天贴壁，个别细胞会在 9~10 天贴壁。细胞贴壁前，需尽量减少对培养皿的晃动，不可频繁移动和观察细胞。最初小簇的细胞难以观察到，需仔细查找全皿，包括皿的边缘。细胞贴壁前需半量换液。若细胞在最初的 2~4 天之内贴壁，需用 UrinEasy 分离完全培养基与 UrinEasy 扩增完全培养基等体积加入；若细胞贴壁在 7 天之后，可直接转入 UrinEasy 扩增完全培养基中培养。若贴壁细胞的状态较差，可以在 UrinEasy 扩增完全培养基中加入 10% 的 FBS。每次全量换液，单簇细胞团汇合度较高，细胞团内部无生长空间或生长空间较小即可传代，建议不超过 14 天，否则易致细胞老化。

### 疑难解答：

#### • 尿液细胞染菌如何避免？

1) 采集尿液时，应对尿道口进行充分擦拭，所有接触的物品需提前灭菌消毒，尿道口清洗后不可再接触，直接排尿至无菌瓶中。

2) 由于尿液采集的环境非无菌级，尽量减少尿液采集操作的时间，无菌瓶在排尿时才开盖，采集完后立即密封瓶口。

3) 收集尿液细胞时，需尽量减少无菌瓶和离心管的开盖时间，移液管不可接触瓶/管外其它部位，每步操作更换新的移液管。

#### • 收集后没有尿液细胞是什么原因？

离心弃除上清的操作容易损失尿液细胞：

1) 弃除上清时，必须将电动移液器的吸液速度调至最小，沿液面缓慢吸液，并保留足够量的剩余液体，过程中不可使底部的液体受到振动，使得沉淀在底部的细胞漂起。

2) 离心机离心力不足，适当加大离心力，但不可高于 300g。

#### • 尿液细胞中含有大量杂质是什么原因？

1) 没有排出晨尿，另外晨尿（一天中第一次排尿）中含有大量杂质，不可采集。

2) 采样者当天的饮食需尽量清淡，不可摄入高蛋白食品。

3) 采样者本身身体因素。

- **尿液细胞不贴壁是什么原因？**

1) 尿液细胞贴壁前，需尽量减少对培养皿的移动，否则影响细胞的贴壁。建议只在换液时移动与观察细胞。

2) 半量换液过程中，将新鲜培养液加入原皿中时，沿壁缓慢加入，或在液面上方以 3s 一滴的速度逐滴加入，避免皿底的细胞受到振动漂起。

3) Matrix 未严格按照要求低温操作，出现粘稠或凝胶化，影响细胞贴壁，更换新的 Matrix 严格按照操作说明书分装与包被。