**小鼠造血干祖细胞单细胞培养**

1. 脱颈处死实验小鼠后，取小鼠的后肢，按实验需求的细胞数量剥离股骨、胫骨、髂骨（若细胞需要量少，则仅取股骨）。1mlPBSE冲洗髓腔。
2. 冲洗后骨髓液经200目尼龙膜过滤去骨头渣子和细胞团块。
3. 1.5rpm\*5min离心，弃上清。每只小鼠40~60ulPBS重悬后，加入10~12ul/只c-kit磁珠，避光孵育15min。
4. 孵育结束后，加入约3倍体积PBS，1.3~1.5rpm\*5min离心后弃上清，1mlPBS重悬，进行磁珠分选。磁珠分选过程参照美天旎MS/LS柱子说明书（具体步骤包括1、1mlPBS润柱，2上样，加入重悬后所得细胞，3，3mlPBS洗柱\*3次，4，将柱子撤下磁铁，放置于15ml离心管上，加入3mlPBS后，用活塞将细胞推出，重复3次。）
5. 1.5rpm\*5min离心，去上清，100ml重悬，每只小鼠7~8ul加入lineage cell detection cocktail （MiltenyiBiotec GmbH , 130-092-613），4℃孵育20min后，加入PBSE 1mL洗去多余抗体1.5rpm\*5min离心，弃上清。（按说明书加入适量流式抗体）。
6. 二抗染色：streptavidin-PE/CY7（Biolegend, cat 405206）、APC/CY7-anti mouse Sca-1 （Biolegend, cat 108125）、APC-anti mouse CD117(cKit) （Biolegend, cat 105811）、FITC-anti mouse CD34 （eBioscience, 11-0341-82）/BV421-anti mouse CD34(BD)、PE-anti mouse CD150（Biolegend）/Percp-cy5.5-anti mouse CD150（Biolegend），PE-anti mouse IL1R1/FITC-anti mouseIL1R2。4℃避光孵育至少90分钟，间隔轻轻震荡。标记完成后1ml的PBSE重悬细胞。上机前半小时加入1/1000体积DAPI。
7. 配培养基，按照实验不同目的配置培养基。基础培养基SFO3，必需因子：SCF（50ng/ml）,PS双抗（买来的双抗即为成品，按照100\*浓度直接应用），白蛋白(500ug/ml)；可选因子（非必须氨基酸NSAA，HEPES，L- Glutamine，Murine-TPO） 如无白蛋白，可应用血清替代，但如体外观察某细胞因子作用，不建议加入血清。
8. 调整流式分选机器，确保机器液流平稳，状态正常，分选类型选择96孔板，分选模式调至

single cell。

1. 进行分选。分选后细胞放置培养箱，按需观察。

**造血干细胞单细胞培养所需试剂：**

SF03培养基

双抗PS（100\*）（Gibco）

ALB（白蛋白，Bioscience）

HEPES(可选)（Gibco）（100\*）

L- Glutamine（可选）（Gibco）（100\*）

Non-essential AA(非必需氨基酸)(可选)（Gibco）（100\*）

Murine-SCF（propertech）(50ng/ml)

Murine-TPO（propertech）(50ng/ml)

FBS（100\*）(可选)

白蛋白，公司Albumin Bioscience，货号1001，1g装