“XXXX”动物外周血淋巴细胞分离液实验方法

技术文档编号：TBD0017SOP

【产品规格】

200ml/Kit

【产品组成】

为方便广大用户使用，试剂内容如下：

	名称	产品编号	规格
A	XXXX 动物外周血淋巴细胞分离液		200ml
B	样本稀释液（赠品）	2010C1119	200ml
C	清洗液（赠品）	2010X1118	200ml
D	说明书		1 份

【实验前准备】

1. 适用仪器

最大离心力可达 1200g 的水平转子离心机

2. 抗凝剂的选择

在动物实验采血时，很多实验者选择医用真空采血管获得抗凝血，医用采血管中的抗凝剂只考虑血浆质量，但不利于高纯度细胞分离实验。

为此，天津灏洋特别开发出专利抗凝剂及抗凝管专用于细胞分离，改变使用普通采血管获得抗凝血分离效果不佳，提取率及纯度低下的不良结果。

序号	产品名称	产品货号	规格
1	TBD™ 细胞分离专用抗凝剂	TBDTM-0050	100ml
2		TBDTM-0200	200ml
3		TBDTM-0500	500ml
4	TBD™ 实验动物一次性使用负压采血管（随试剂盒附赠 5 支）	TBDTM-0001	5ml/支

3. PBMC 高效离心管（详见 PBMC 高效离心管使用说明）

序号	产品名称	产品货号	规格
1	PBMC 高效离心管	601001	50ml
2	PBMC 高效离心管(随试剂盒附赠 5 支)	601002	15ml

【检验方法】

全过程样本、试剂及实验环境均需在 20±2℃的条件下进行。

首先取抗凝血按体积比 1:1 的比例与样本稀释液（产品编号：2010C1119）混匀，根据稀释后的样本量大小，分以下两种情况：

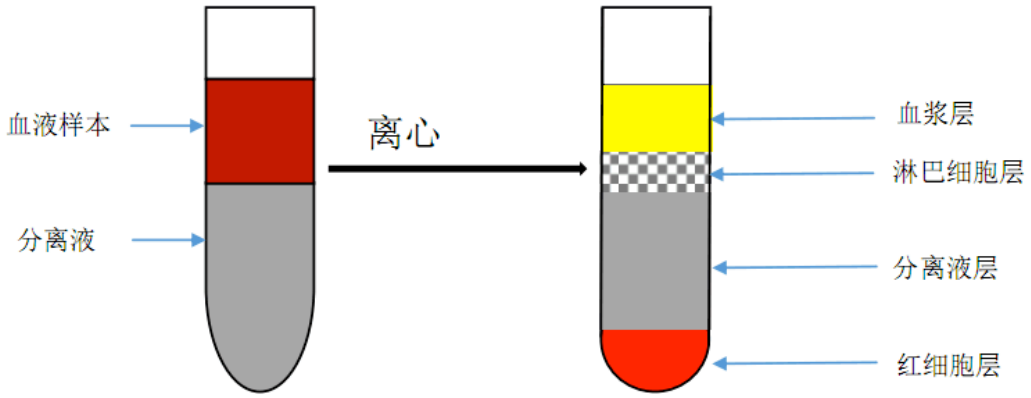
情况 A：稀释后的血液样本量小于 5ml 时，实验方法如下：

1. 取一支 15ml 离心管，先加入与稀释后样本等量的分离液（注：分离液最少不得少于 3ml）。
2. 用吸管小心吸取稀释后的血液样本加于分离液液面上，400-500g，离心 20-30min（注：根据血液样本量确定离心条件，血液样本量越多，离心力越大，离心时间越长，具体离心条件需客户自行摸索，以达到最佳分离效果）。
3. 离心后，此时离心管中由上至下分为四层。第一层为血浆层。第二层为环状乳白色淋巴细胞层。第三层为透明分离液层。第四层为红细胞层。
4. 用吸管小心吸取第二层环状乳白色淋巴细胞层到另一 15ml 离心管中，往所得离心管中加入 10ml 清洗液（产品编号：2010X1118），混匀细胞。
5. 250g，离心 10min。
6. 弃上清。
7. 用吸管以 5ml 清洗液（产品编号：2010X1118）重悬所得细胞。
8. 250g，离心 10min。
9. 重复 6、7、8，弃上清后以 0.5ml 后续实验所需相应液体重悬细胞。

情况 B：稀释后的血液样本量大于等于 5ml 时，实验方法如下：

1. 取一支适当的离心管，先加入与稀释后样本等量的分离液。
2. 将经稀释后的血液样本小心加于分离液之液面上，550-650g（最大离心力可至 1000g），离心 20-30min。（注：根据血液样本量确定离心条件，血液量越多，离心力越大，离心时间越长，具体离心条件需客户自行摸索，以达到最佳分离效果。加入血液样本后，样本及分离液总体积不得超过离心管总体积的三分之二）。
3. 剩余步骤同“情况 A”中步骤 3 至步骤 9。

分离图例



【注意事项】

1. 全过程样本、试剂及实验环境均需在 20±2℃的条件下进行。为获得最佳的实验结果，最好在取血 2h 内进行实验，血液存放时间越长，细胞分离效果越差。血液放置超过 6h 后分离效果更差甚至不能达到分离目的。
2. 本实验最好不要使用高聚合材质（如聚苯乙烯）的塑料制品，应使用无静电、低静电离心管及未经碱处理过后的玻璃制品，因为静电作用将导致细胞贴壁、碱处理的玻璃表面会变成毛面，影响细胞分离效果。
3. 吸取过多的淋巴细胞层及分离液层会导致分离液交界处的粒细胞被吸出从而使混杂的粒细胞数量增加。
4. 吸取过多的淋巴细胞层上层溶液会导致血浆蛋白及血小板混杂。
5. 如所实验后细胞得率或活性过低，请联系天津灏洋技术支持以寻求帮助，具体联系方式详见下方生产企业信息。

【储存条件及有效期】

常温保存，有效期 2 年。本品易感染细菌，需无菌条件操作。无菌条件下操作，启封后置常温保存。如 4℃保存，本分离液易出现白色结晶，影响分离效果。

【参考值（参考范围）】

本实验淋巴细胞提取率及纯度均大于 80%。

下表为成年人外周血中各种细胞的数量及比例，用户可适当进行参考。

	红细胞	白细胞	血小板
含量（个/L）	（4.0-5.5）×10^{12}	（4.0-10.0）×10^{9}	（1.0-3.0）×10^{11}

		中性粒细胞	淋巴细胞	单核细胞	
		50%-70%	20%-40%	3%-8%	

【相关实验技术方案】

1. 所获得淋巴细胞的培养技术。
2. 所获得淋巴细胞的核酸提取技术。
3. 所获得淋巴细胞的鉴定方法

   A.流式细胞技术

   B.免疫组化技术

   C.原位杂交技术

   D.PCR 技术

注：上述技术方案详情请登陆本公司官网：www.tbdscience.com，搜索“天津灏洋细胞分离、纯化、扩增、鉴定及生物治疗技术手册”，并在说明书项目栏下下载使用。

【可能存在的问题及解决方法】

1. 由于血液粘度、细胞密度等差异可能造成的问题及解决方案如下表所示：

出现情况	出现原因	建议解决方案
离心后目的细胞存在于血浆层或稀释液层	转速过小或离心时间过短	适当增减转速
离心后目的细胞存在于分离液中	转速过大或离心时间过长	
离心后白环层弥散	细胞密度过大	调整细胞密度
离心后白环层太浅或看不见	细胞密度过小	

2. 本分离液分离细胞的原理为密度梯度离心，其密度与温度、大气压等密切相关。不同地区客户可根据当地情况对离心条件进行适当调整。建议对离心条件进行调整时，恒定离心时间，对离心转速进行调整。
3. 本分离液依照国际标准，全部使用药用级原料，性能指标与国产同类产品略有不同，可能出现红细胞沉降不完全的情况，可以适当加大离心转速。

注：在对离心条件进行调整时，离心转速的加减以 50-100g 为基数，直至达到最佳分离效果，离心力最小不得小于 400g，最大不得大于 1200g。离心时间以 20-30min 为准。