

大（小）鼠外周血淋巴细胞分离液实验方法

【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	大（小）鼠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。

（离心机使用时调整为慢升慢降（具体参数请咨询离心机厂家）建议升速（指开始启动→达到设定离心力）的时间、降速（指设定离心时间完成→机器完全停止）时间均控制在 3 分钟左右。）

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（或必须使用枸橼酸钠的医用真空抗凝采血管）。

为此，天津灏洋特别开发出专用实验动物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. 无菌硅化离心管(少量血液样本专用离心管)

序号	产品名称	产品货号	规格
----	------	------	----

1	无菌玻璃离心管/5mL(随试剂盒附赠 5 支)	TUB2016	100 支/包
2	无菌硅化离心管/10mL(随试剂盒附赠 5 支)	TUB2015	100 支/包

4. PBMC 最佳分离时间

血液离体后 2 小时内。如达不到 2 小时内分血条件，请务必于 4 小时内进行分血步骤，超过 4 小时很难顺利进行分离。

血液离体时间	分离效果
2 小时内	最佳
2-4 小时	可接受
4-6 小时	细胞活性下降，分离效果不佳
6 小时以上	分离效果极差，直至分离不出细胞

5. 分离液的使用环境

- 分离液需常温（37℃-15℃）避光保存，严禁冷藏冷冻保存；
- 使用时严格**遵守无菌操作规范**（超净工作台或生物安全柜内），并在 18℃-22℃环境温度下进行操作，20℃条件下分离效果最佳。超出此温度范围，有可能使分离液密度发生改变，造成分离效果不佳。

6. 参考值（目的细胞参考范围）

本试剂盒可保证目的细胞的提取率大于 80%，不是纯度。如需获得高纯度目的细胞，请配合免疫磁珠分选。本试剂盒可减少磁珠的使用量，减少成本。

【检验方法】

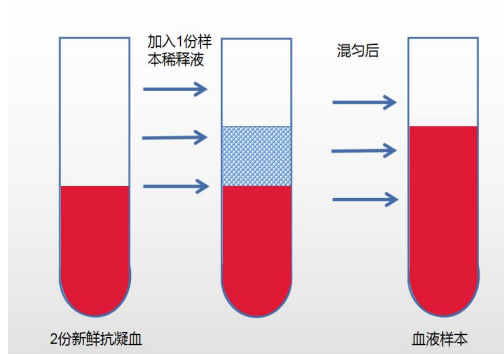
全过程样本、试剂及实验环境均需在 20±2℃（试剂需要复温。夏季 20℃，冬季 25℃。）的条件下进行。

血液样本需要稀释时，实验方法如下：

稀释方法：1 份的 PBS 或样本稀释液(产品编号：2010C1119)加 2 份的血液进行稀释
(PBS:抗凝血=1:2)；

注：稀释液要求：用不含钙镁离子的缓冲液或培养基进行血液稀释。

稀释图例

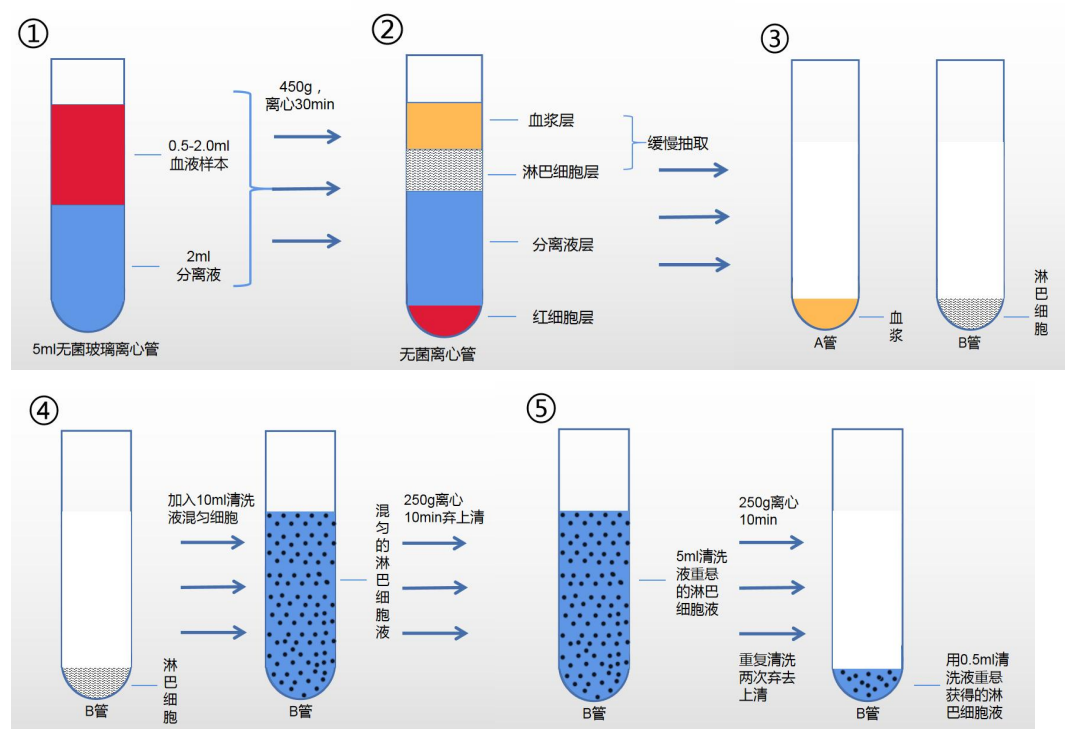


根据血液样本，分以下两种情况：

情况 A：血液样本量 0.5-2.0ml 时，实验方法如下：

1. 取一支 5ml 无菌玻璃离心管（货号：TUB2016），加入 2ml 分离液，再缓慢加入 0.5-2.0ml 血液样本。血液样本小心加于分离液液界面之上。（分离液不得少于 1ml，血液样本不得少于 0.5ml）
2. 以 450g，离心 30min。（注：如改变血液样本及分离液用量，需相应调整离心力及离心时间；如使用 5ml 无菌玻璃离心管，可能需要使用 50ml 的 PBMC 高效离心管。）
3. 离心后，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（大/小鼠）淋巴细胞层。第三层为透明分离液层。第四层为红细胞层。
4. ①小心吸取血浆层转移到新离心管 A 中。
②小心吸取离心管中的环状乳白色（大/小鼠）淋巴细胞层转移到新离心管 B 中。
5. 向含有（大/小鼠）淋巴细胞的离心管 B 中，加入 10ml 清洗液（产品编号：2010X1118），混匀细胞。
6. 250g，离心 10min。弃去上清。
7. 用吸管吸取 5ml 清洗液（产品编号：2010X1118）重悬所得细胞。
8. 250g，离心 10min，弃去上清。
9. 重复清洗两次，弃去上清，用 0.5ml 清洗液（产品编号：2010X1118）或根据下一步实验要求加入相对应液体，重悬所得细胞。

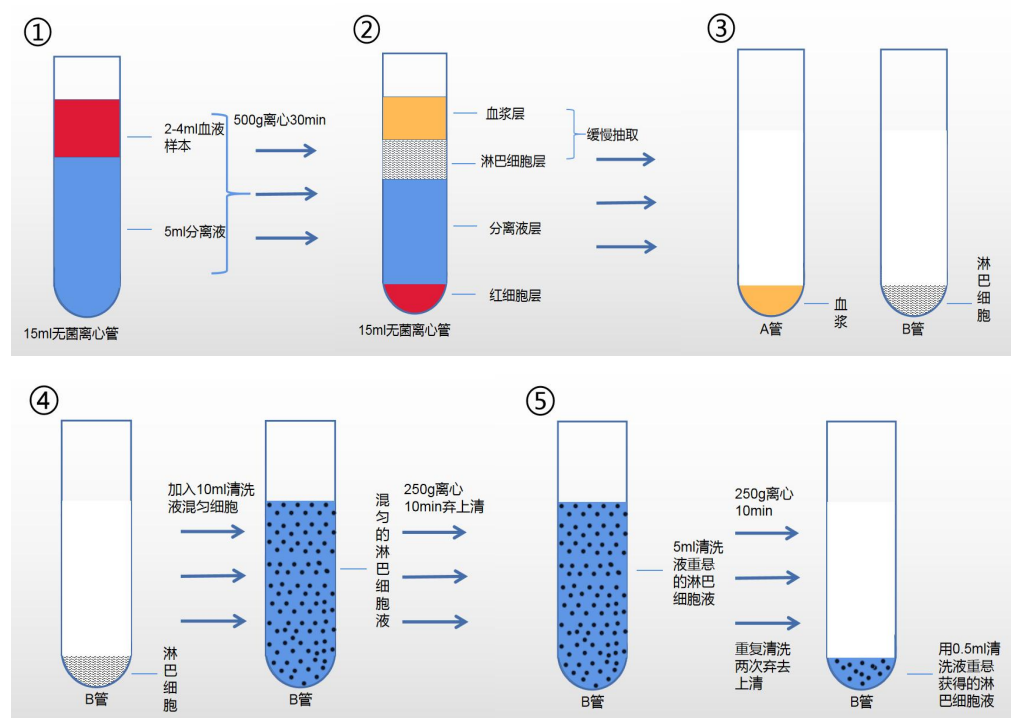
分离图例



情况 B: 血液样本量 2.0-4.0ml 时, 实验方法如下:

1. 取 15ml 的无菌离心管, 小心加入 5ml 分离液, 加入血液样本量 2.0-4.0ml。血液样本小心加于分离液界面之上。(总液体量不得超过 2/3)
或(取 10ml 的无菌硅化离心管(货号: TUB2015), 小心加入 4ml 分离液, 加入血液样本量 2.0-4.0ml。血液样本小心加于分离液界面之上。(总液体量不得超过 2/3))
2. 以 500g, 离心 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。)
3. 离心后, 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(大/小鼠)淋巴细胞层。第三层为透明分离液层。第四层为红细胞层。
4. ①小心吸取血浆层转移到新离心管 A 中。
②小心吸取离心管中的环状乳白色(大/小鼠)淋巴细胞层转移到新离心管 B 中。
5. 向含有(大/小鼠)淋巴细胞的离心管 B 中, 加入 10ml 清洗液(产品编号: 2010X1118), 混匀细胞。
6. 250g, 离心 10min。弃去上清。
7. 用吸管吸取 5ml 清洗液(产品编号: 2010X1118)重悬所得细胞。
8. 250g, 离心 10min, 弃去上清。
9. 重复清洗两次, 弃去上清, 用 0.5ml 清洗液(产品编号: 2010X1118)或根据下一步实验要求加入相对应液体, 重悬所得细胞。

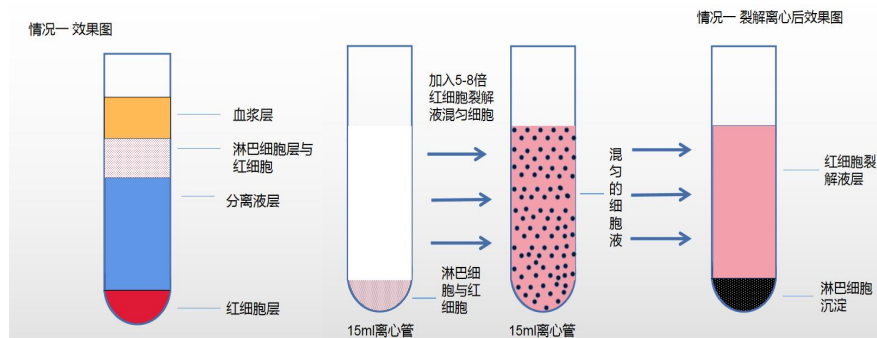
分离图例



【分离过程中可能出现的情况及处理方案】

情况一：淋巴细胞层混杂红细胞

1. 吸取有红细胞混杂的淋巴细胞层。
2. 取 15 毫升离心管加入红细胞混杂的淋巴细胞层，根据红细胞残余数量酌情加入 5-8 倍红细胞裂解液。
- a. 如有红细胞混杂则加入适量红细胞裂解液（产品编号：NH4CL2009 需另购）将红细胞裂解（具体方法见“红细胞裂解液使用说明”）即得目的细胞。
- b. 参考红细胞裂解液说明书操作。少时多次裂解后获得淋巴细胞。



【注意事项】

1. 本实验最好不使用高聚合材质（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。
2. 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。
3. 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。
4. 不当的稀释方法会降低细胞得率及活性。稀释液要求：不含钙镁离子的缓冲液或培养基。血液样本经过稀释则分离过程中需适当降低离心力和离心时间。
5. 如实验后细胞得率或活性过低，请联系技术支持以寻求帮助。

【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大于 80%。

下表为小鼠外周血中各种细胞的数量及比例，用户可适当进行参考。（参考百度文库）

	红细胞	白细胞			血小板
含量 (个/ μ L)	$(10.6\pm 0.4) \times 10^3$	$(2.6\pm 0.9) \times 10^3$			$(1157\pm 123) \times 10^3$
		中性粒细胞	淋巴细胞	单核细胞	
		20%-30%	50%-70%	3%-8%	

【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. 离心力公式及单位换算

<http://www.shanjin.com.cn/news/23.html>

3. 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。
4. 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。