

人&各种动物外周血白细胞分离液说明书

(细胞培养及分子生物学专用)

技术文档编号： TBD0031SOP

【包装规格】

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	人&各种动物外周血白细胞分离液		200ml
B	样本稀释液（赠品）	2010C1119	200ml
C	清洗液（赠品）	2010X1118	200ml
D	红细胞裂解液（赠品）	NH4CL2009	100ml
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. 目的细胞最佳分离时间

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

4. 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。

5. 无菌离心管

序号	产品名称	产品货号	规格
1	无菌硅化离心管/10ml(随试剂盒附赠 5 支)	TUB2015	100 支/包
2	PBMC 高效离心管/50ml	601001	20 支/盒
3	PBMC 高效离心管/15ml	601002	5 支/包

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。

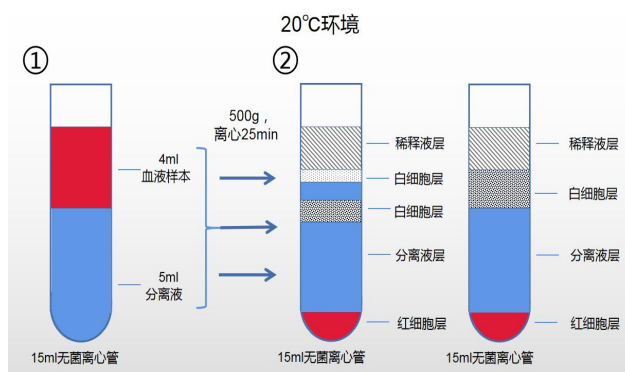
各种规格离心管的使用方法（推荐最佳方法）

取一支无菌离心管，加入分离液，后缓慢加入血液样本或新鲜抗凝血。血液样本或新鲜抗凝血小心加于分离液液界面之上。（若采血量较少，需小量分离，分离液的量不得少于 3ml，抗凝血量在 0.2-3ml 之间）

1. 15ml 离心管（包括高效离心管）：

- A. 最佳比例：5ml 分离液+ 4ml 稀释过的血液；
- B. 最佳离心条件：20℃ 环境下，500g 离心 25min。

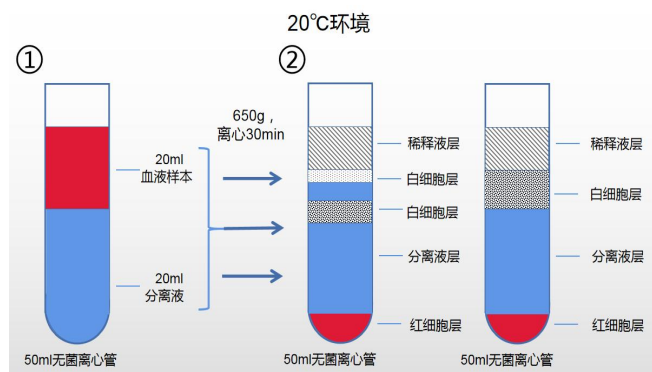
注：离心后，两种情况均正常，均可以接受。取出全部（一层或两层）白细胞即可。



2. 50ml 离心管（包括高效离心管）：

- A. 最佳比例：20ml 分离液+ 20ml 稀释过的血液；
- B. 最佳离心条件：20℃ 环境下，650g 离心 30min。

注：离心后，两种情况均正常，均可以接受。取出全部（一层或两层）白细胞即可。

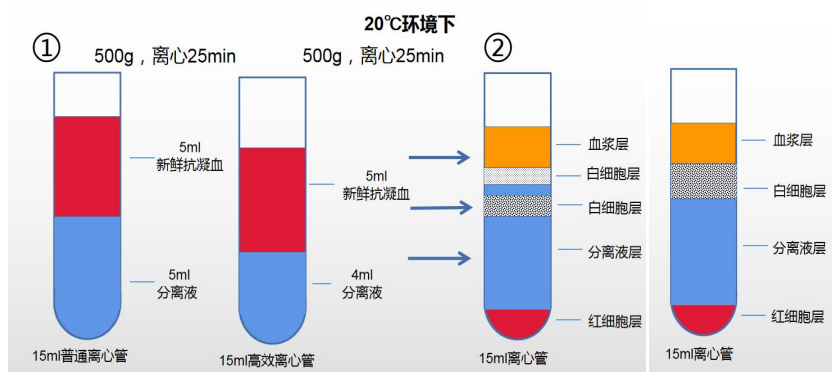


未经稀释的抗凝血分离方法（细胞培养、或需保存血浆推荐用此方法）：

3. 使用 15ml 离心管（或 15ml 高效离心管）

- A. 15ml 普通离心管最佳比例：5ml 分离液+ 5ml 抗凝血；
- B. 15ml 高效离心管最佳比例：4ml 分离液+ 5ml 抗凝血；
- C. 最佳离心条件：20℃ 环境下，500g 离心 25min。

注：离心后，两种情况均正常，均可以接受。取出全部（一层或两层）白细胞即可。



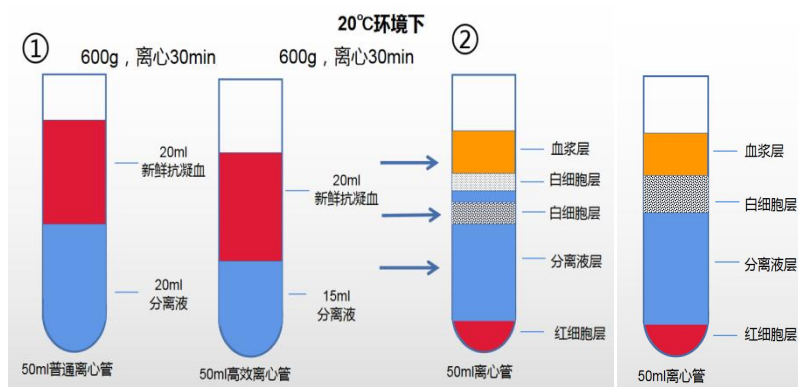
4. 使用 50ml 离心管（或 50ml 高效离心管）

A. 50ml 普通离心管最佳比例：20ml 分离液+ 20ml 抗凝血；

B. 50ml 高效离心管最佳比例：15ml 分离液+ 20ml 抗凝血；

C. 最佳离心条件：20℃ 环境下，600g 离心 30min。

注：离心后，两种情况均正常，均可以接受。取出全部（一层或两层）白细胞即可。



实验后续方案

- 离心后，离心管中由上至下分为五层。第一层为血浆层（稀释液层）。第二层为环状乳白色白细胞层。第三层为环状乳白色白细胞层。第四层为透明分离液层。第五层为红细胞层。

注：离心管可能分为四层，第二层和第三层可能混淆在一起，全部取出即可。

- ①小心吸取血浆层（稀释液层）转移到新离心管 A 中。
②小心吸取离心管中的第一层环状乳白色白细胞层转移到离心管 B 中
③小心吸取离心管中的第二层环状乳白色白细胞层转移到离心管 B 中。
- 向含有(人&各种动物)白细胞的离心管 B 中，加入 5-10ml 清洗液(产品编号:2010X1118)，混匀细胞。

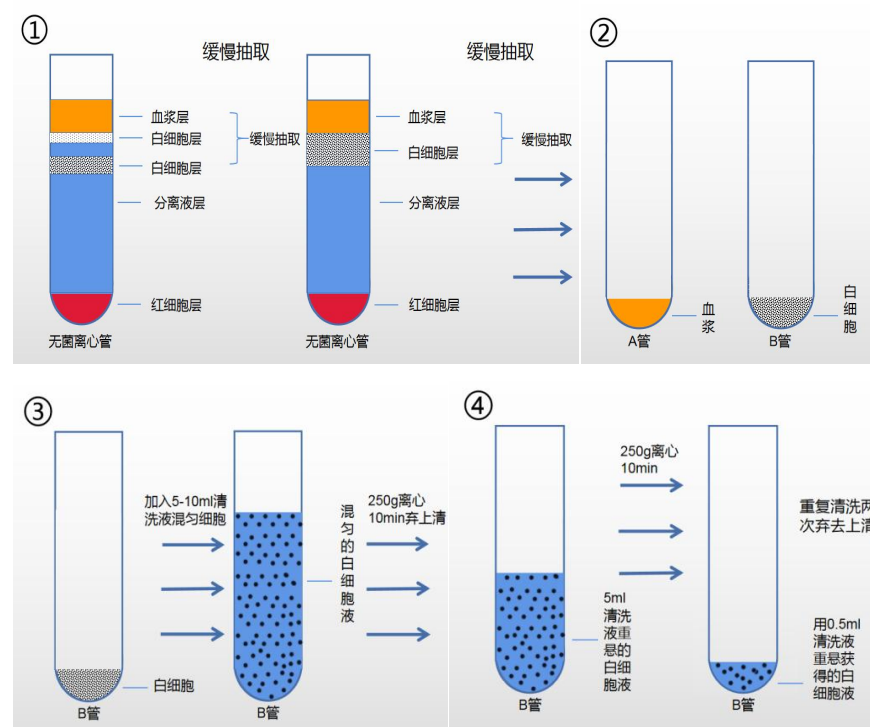
4. 250g，离心 10min。弃去上清。

5. 用吸管吸取 5ml 清洗液（产品编号：2010X1118）重悬所得细胞。

6. 250g，离心 10min，弃去上清。

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。

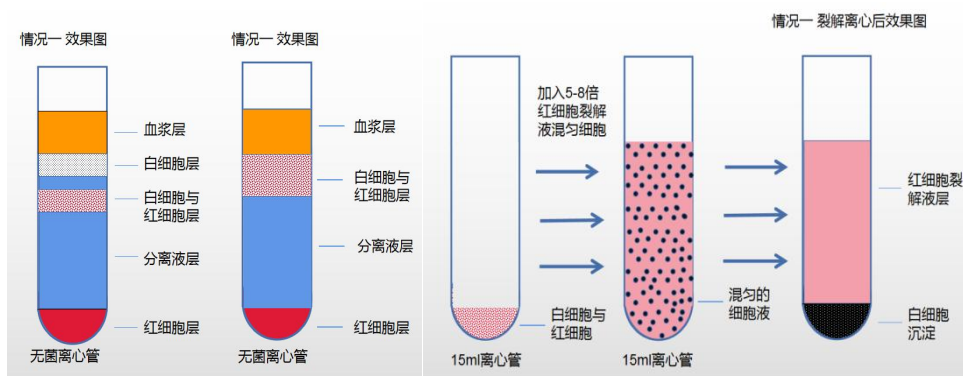
分离图例



【分离过程中可能出现的情况及处理方案】

情况一：白细胞层混杂红细胞

1. 吸取有红细胞混杂的白细胞层。
2. 取 15 毫升离心管加入红细胞混杂的白细胞层，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）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白细胞。



【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。
2. 分离液用量大于稀释后血液样本时，分离效果更佳。
3. 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。
4. 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）】

本实验白细胞提取率及大于 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)	$(4.0-5.5) \times 10^{12}$	$(4.0-10.0) \times 10^9$			$(1.0-3.0) \times 10^{11}$
		中性粒细胞	淋巴细胞	单核细胞	
		50%-70%	20%-40%	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。