人外周血淋巴细胞分离液

产品编号	产品名称	规格
BL590	人外周血淋巴细胞分离液	200 ml

产品简介：

人血中红细胞和白细胞等细胞密度较大，为 1.090g/ml 左右，淋巴细胞和单核细胞密度为 1.075~1.090g/ml，血小板为 1.030~1.035g/ml，本产品为密度在 1.077 g/mL 并且与外周全血等渗的溶液（分离液），经过密度梯度离心，使一定密度的细胞按照相应密度梯度分布，从各种血细胞中分离出淋巴细胞。

本实验淋巴细胞提取率及纯度均大于 80%。

使用方法：

常规实验操作方法：

1、取新鲜抗凝血 2ml，用等体积 PBS 或 Hank’s 液混匀。

2、在离心管中加入 3ml 分离液，小心将稀释后的血样平铺到分离液液面上方。

3、离心 400 g，30-40 min。

4、离心结束后，此时离心管中由上至下细胞分四层：第一层为血浆层，第二层为环状乳白色淋巴细胞，第三层为透明分离液层，第四层为红细胞层。

5、小心吸取第二层细胞到另一离心管中，加入三倍体积的 PBS 或 Hank’s 液混匀，60-100g，离心 10min，弃上清。

6、加 6-8ml 的 PBS 或 Hank’s 液混匀，60-100g，离心 10min，弃上清。以 0.5ml 后续实验所需相应液体重悬目的细胞。

注：血液样品量增大时，可通过改变离心管直径的方法始终保持样本量高度与分离液高度为 2、4cm 与 3cm，其他分离条件不变。

为满足客户实际使用需求，不同血液样本量推荐具体实验操作方法如下：

一、 使用 15ml 离心管时：

情况 A：血液样本量小于 3ml 时，实验方法如下：

1、 取一支 15ml 离心管，加入 3ml 分离液。

2、 用吸管小心吸取血液样本加于分离液之液面上，400-650g，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，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，向所得离心管中加入 10ml PBS 或 Hank's 液，混匀细胞。

5、 250g，离心 10min。

6、 弃上清。

7、 用吸管以 5ml PBS 或 Hank's 液重悬所得细胞。

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：血液样本量为 3-6ml 时，实验方法如下：

1、 取一支 15ml 离心管，先加入与血液样本等量的分离液。

2、 用吸管小心吸取血液样本加于分离液之液面上，450-650g，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，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，向所得离心管中加入 10mlPBS 或 Hank's 液，混匀细胞。

5、 250g，离心 10min。

6、 弃上清。

7、 用吸管以 5ml PBS 或 Hank's 液重悬所得细胞。

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。

二、 使用 50ml 离心管时：

情况 A：血液样本量为 6-10ml 时，实验方法如下：

1、 取一支 50ml 离心管，先加入与血液样本等量的分离液。

2、 用吸管小心吸取血液样本加于分离液之液面上，500-950g，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，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，向所得离心管中加入 10ml PBS 或 Hank's 液，混匀细胞。

5、 250g，离心 10min。

6、 弃上清。

7、 用吸管以 5ml PBS 或 Hank's 液重悬所得细胞。

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：血液样本量为 10-20ml 时，实验方法如下：

1、 取一支 50ml 离心管，先加入与血液样本等量的分离液。

2、 用吸管小心吸取血液样本加于分离液之液面上，500-1100g，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，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，向所得离心管中加入 10ml PBS 或 Hank’s 液，混匀细胞。

5、 250g，离心 10min。

6、 弃上清。

7、 用吸管以 5ml PBS 或 Hank’s 液重悬所得细胞。

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。

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、当血液样本粘度过高需稀释时，最优稀释方法：将血液与 PBS 或 Hank’s 液 1：1 混匀备用。注：不当的稀释方法会降低细胞得率及活性。如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。

6、 因血液样本的个体差异及血液粘度不同，需调整离心力及离心时间，离心力最大不超过 1000g。

保存条件：

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。

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。