

## 动物外周血淋巴细胞分离液 KIT 说明书

货号：P8620/P8630/P8640/P8730/P8740/P8750/P8760/P8770

保存：18℃-25℃避光保存，有效期两年,保存温度较低 10℃易出现白色结晶，影响分离效果。

### 产品组成：

| 名称             | 货号    | 规格    |
|----------------|-------|-------|
| 各种动物外周血淋巴细胞分离液 |       | 200ml |
| 全血及组织稀释液       | R1017 | 200ml |
| 细胞洗涤液          | R1018 | 200ml |

### 产品简介：

本分离液为Ficoll、羟乙基淀粉550与泛影酸葡甲胺的混合液。抗凝外周血可在分离液中分层。离心时，在Ficoll、羟乙基淀粉的作用下红细胞与粒细胞聚集并迅速沉降；此时，淋巴细胞及其他单个核细胞仍处于分离液上层，红细胞污染可忽略不计。大部分血小板可在细胞清洗低速离心过程中去除。其他人及动物多种比重细胞分离液，因不同种属不同比重分离液的细胞离散系数及细胞带电不同，用户在制定分离液时应提供所需分离液的比重、动物种属及被分离细胞的名称。

适用于从动物抗凝血液中分离淋巴细胞，无菌条件下分离的淋巴细胞可用于培养。本品仅供科研使用。

### 注意事项：

- 本实验要求，在正常大气压下，分离液、分离样本以及分离环境温度为 $20^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 。分离液在低温时呈较高密度，在高温时呈较低密度。细胞分离液从冰箱取出后，不可立即使用，操作前可将样本和分离液复温至 $18-22^{\circ}\text{C}$ 。为获得最佳的实验结果，最好在取血后2小时内进行实验，血液提取后存放时间越长细胞活性越低。
- 实验过程中，如需稀释血液或洗涤细胞，不可使用含Ca、Mg离子的缓冲液及培养液，其成分会导致血细胞凝集，大大降低细胞得率及纯度。
- 最优抗凝剂选择：EDTA、枸橼酸、肝素，其他抗凝剂也可使用，但会影响细胞活性。应注意在血液稀释过程中去除抗凝剂体积。
- 实验操作时，不可使用含粉手套、不可使用内毒素含量过高的液体，手套中的粉末颗粒及高内毒素会激活淋巴细胞从而降低细胞得率及活性。
- 本实验不可使用高聚合材质（如聚苯乙烯）的塑料制品，其带有的静电作用将导致细胞贴壁影响分离效果。推荐使用未经过碱处理的玻璃离心管。
- 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。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。
- 如需进行B、T细胞计数，则需血液贮藏时间不得多于10小时，否则将导致细胞被激活，得率降低。

H. 为去除所混杂的血小板，可在分离液上层加上4-20%蔗糖梯度等渗溶液进行二次离心。

I. 细胞纯度可在步骤10后使用瑞氏染色方法确定，细胞活性可用台盼蓝处理后观察。

J. 由于各品牌离心机的性能不同，国内南北地区温度环境和四季的差异，可能影响分离效果，用户可以调节离心转数和离心时间，摸索最佳的分离条件（具体分离条件各实验室自定）。

### 分离方法：

一、当血液样本小于3ml时，实验方法如下：

1. 取一支15ml离心管，加入3ml分离液置于18-22℃复温。
2. 将血液样本小心加于分离液之液面上。18-22℃，400g离心20分钟。低温（如4℃）离心会降低细胞得率。
3. 离心后，用吸管小心吸出分离液上层（包含淋巴细胞的细胞层）0.5cm以上的上清液部分，弃去。
4. 用吸管小心吸取分离液层及淋巴细胞层至于另一新离心管内。
5. 在步骤4中所得离心管中加入10ml 细胞洗涤液混匀。
6. 250g离心10分钟。
7. 弃上清。
8. 用吸管以5ml 细胞洗涤液重悬所得细胞。
9. 250g离心10分钟。
10. 弃上清。重复步骤7、8、9，后以0.5ml后续试验所需相应液体重悬细胞。

二、当血液样本大于3ml时，实验方法如下：

1. 当血液样本粘度过高或血液样本大于等于3ml时，最优稀释方法：将血液于18-22℃以250g离心10分钟，弃去血浆，补充添加全血及组织稀释液，添加量为所弃去血浆体积的1.5-2倍，混匀备用。注：不当的稀释方法会降低细胞得率及活性。
2. 取一支适当的离心管，加入分离液（加入量与稀释后的血液样本体积相等），置于18-22℃复温。
3. 将经稀释处理的血液样本小心加于分离液之液面上。18-22℃，400g离心20分钟。低温（如4℃）离心会降低细胞得率。注：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。
4. 剩余步骤同“情况一”中步骤3至步骤10。

