

人外周血淋巴细胞分离液

产品编号	产品名称	包装
C0025-200ml	人外周血淋巴细胞分离液	200ml

产品简介:

- 碧云天生产的人外周血淋巴细胞分离液(Human Peripheral Blood Lymphocyte Separation Medium)是一种基于密度梯度离心原理, 简单、快速、高效地从人外周血、脐带血或骨髓细胞中分离出淋巴细胞和单核细胞等细胞的分离液, 也称为淋巴细胞分离液(Lymphocyte Separation Medium, LSM)、淋巴细胞梯度分离液、Density gradient medium、PBMC分离液、PBMC样本密度分离液或PBMC细胞分离液。本分离液的密度为1.077g/ml (20°C), 与外周全血近于等渗。本分离液和Ficoll-Paque 1.077、Ficoll-Hypaque、Histopaque-1077等在功能和使用方法上几乎完全一致。
- 人外周血细胞包括红细胞(Red blood cell, RBC, 即Erythrocyte)、白细胞(White blood cell, WBC, 即Leukocyte)和血小板(Platelet)。红细胞是血液中数量最多的一类血细胞, 是血液运送氧气最主要的媒介, 哺乳动物成熟的红细胞是无核的; 白细胞是一种不均一的细胞群, 生理学上根据其形态、功能和来源分为多核的粒细胞(Granulocyte, 包括中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞)及单核的细胞(Peripheral blood mononuclear cell, PBMC, 包括淋巴细胞(Lymphocyte)和单核细胞(Monocyte)); 血小板是从骨髓成熟的巨核细胞胞浆裂解脱落下来的小块胞质, 体积很小, 具有凝血、止血功能[1]。
- 淋巴细胞是体积最小的白细胞, 约占白细胞的20-40% [2]。淋巴细胞由淋巴器官产生, 主要存在于淋巴管中循环的淋巴液里, 是具有特异免疫识别功能的细胞系, 在机体抗炎症、抗感染及抗肿瘤等免疫过程中发挥着重要作用[3,4]。根据发生迁移、表面分子和功能的不同, 淋巴细胞分为T淋巴细胞、B淋巴细胞和自然杀伤(NK)细胞三大类。其中T淋巴细胞和B淋巴细胞均来自造血组织。T淋巴细胞参与细胞免疫(Cell-mediated immunity), 主要免疫功能包括抗胞内感染、抗肿瘤细胞和异体细胞等。目前有重要临床应用的CAR-T (Chimeric antigen receptor T cell, 嵌合抗原受体T细胞)就是一种基于T淋巴细胞的细胞免疫疗法。B淋巴细胞参与体液免疫(Humoral immunity), 其主要功能是产生抗体, 提呈抗原及分泌细胞因子参与免疫调节; NK细胞由骨髓中的淋巴干细胞分化而来, 可直接发挥细胞毒性效应, 杀伤病毒感染细胞、肿瘤细胞和异体细胞。淋巴细胞检测是临床血常规项目之一, 淋巴细胞异常提示细菌感染、病毒感染、淋巴细胞系统增殖性疾病、再生贫血障碍等。因此, 分离和检测淋巴细胞具有重要临床意义。
- 人外周血中不同血细胞的体积、形态和比重(密度)有所差异: 红细胞和粒细胞的比重较大, 约1.092; 单核的细胞(淋巴细胞和单核细胞)的比重约为1.075, 血小板约为1.030 [5]。因此利用一种分离液, 其比重在1.075-1.090之间, 淋巴细胞和单核细胞由于比重较小在这种分离液中浮起, 而红细胞和粒细胞的比重较大, 在该分离液中将下沉, 从而将单核的细胞从外周血细胞中分离出来。最常用的分离液是采用聚蔗糖(Polysucrose 400/Ficoll 400)和泛影酸钠(Sodium diatrizoate)配制的混合比重约1.070的溶液[6]。
- 碧云天的人外周血淋巴细胞分离液经过一定的配方优化和改良, 20°C时的密度约为1.077g/ml, 和外周血近于等渗。通过本分离液进行密度梯度离心, 离心管中的细胞或液体由上至下分四层: 血浆和血小板密度较低, 悬浮于分离液的上部, 为第一层; 单核的细胞(PBMC, 包含淋巴细胞和单核细胞)的密度稍低于分离液, 位于分离液界面之上, 一般为环状乳白色, 为第二层, 所以移去第一层就可获得PBMC; 第三层为透明分离液层; 红细胞与粒细胞密度较大, 沉于底部, 为第四层。

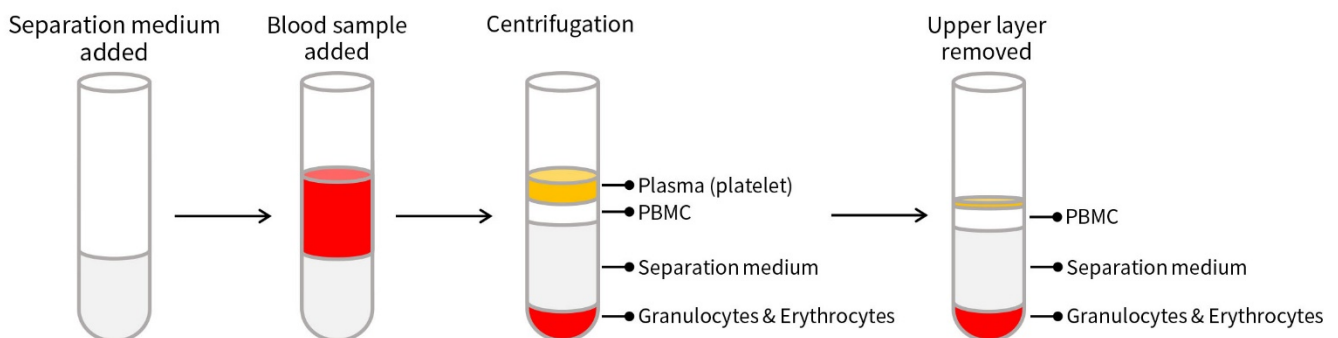


图1. 人外周血淋巴细胞分离液(C0025)分离人外周血效果示意图。

- 本产品操作简单, 操作时间短, 分离率高。整个实验只需要简单的移液、离心操作, 即可在约1个小时内完成样品淋巴细胞的分离。本产品对于淋巴细胞分离的提取率大于80%。如需获得高纯度目的细胞, 可配合使用免疫磁珠进行分选。使用本试剂盒预分离, 可减少磁珠的使用量, 降低成本。
- 本产品品质高, 质量控制严格。本分离液使用药用级原料, 配方经过优化处理, 无菌, 内毒素小于0.5EU/ml。
- 本产品应用范围广。本产品不仅适用于稀释后的抗凝血液样品, 也可用于未经稀释的抗凝血液样品; 可分离淋巴细胞, 还可分离

一定纯度的血浆；分离得到的淋巴细胞可直接检测，也可进行细胞培养。

- 按使用说明操作，样品体积为5ml时，200ml本产品可进行约40次淋巴细胞分离。

包装清单：

产品编号	产品名称	包装
C0025-200ml	人外周血淋巴细胞分离液	200ml
—	说明书	1份

保存条件：

室温避光保存，两年有效。本产品严禁冷藏或冷冻保存。

注意事项：

- 使用本产品前须颠倒混匀，并在无菌条件下吸取，避免微生物污染。
- 如果要对分离的淋巴细胞进一步培养，须在收集血液和分离过程中，注意无菌操作，避免微生物污染。
- 本产品宜室温保存，严禁冷藏冷冻保存。低温条件下，本产品会出现白色结晶，影响分离效果。
- 由于本产品在低温时密度升高，而在高温的时候密度会降低，因此使用本产品的温度要求是18-22°C，最佳分离温度是20°C。
- 不同血液样品，分离效果不同。相比外周血，脐带血由于离体时间较长、运输等因素可能导致其分离效果不佳。血液样品宿主身体状况、使用药物情况、患病情况及性别等因素均可能影响分离效果。
- 部分塑料的离心管(如聚苯乙烯，PS)带有静电，可能会导致细胞挂壁，影响分离效果。推荐使用碧云天聚丙烯材质的离心管(FTUB515/FTUB550)。
- 为避免细胞活性降低和提高淋巴细胞分离效果，请选用不含有钙镁离子的缓冲液或生理盐水对血液样品进行稀释。
- 由于不同种属动物免疫细胞密度的差异，本产品仅适用于人外周血淋巴细胞分离，不适用于其它动物。不同动物血液须选用特定的分离液。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明：

1. 实验前准备：

- 需自备水平转子离心机(离心力 $\geq 1200 \times g$)。整个梯度离心要求是慢升慢降，需要设置离心机的加速度为1-3，关闭刹车，须自然停止。
- 抗凝剂的选择：若分离出的淋巴细胞直接用于检测，可选用枸橼酸钠抗凝剂；若分离出的淋巴细胞需进一步培养，则选用肝素抗凝剂。
- 血液样品应是新鲜抗凝血，避免冷藏或冷冻。血液样品离体2小时内分离效果最佳；血液样品离体2-4小时，分离效果尚可；血液样品离体4小时以上，分离效果差或无法进行分离操作。
- 为保证最佳分离效果，**整个实验过程要求检测样品、使用试剂、离心及实验室的温度均保持在 $20 \pm 2^\circ\text{C}$ 。**

2. 血液样品的稀释(选做)：

- 选用不含有钙镁离子缓冲液或生理盐水或培养基对样品进行稀释。推荐选择碧云天生产的PBS(C0221A)和生理盐水(ST341)。
- 按照血液样品:PBS或生理盐水=2:1的比例对血液样品进行稀释。

3. 淋巴细胞的分离：

- 分离液和血液样品的加入：取一支新的15ml或50ml无菌离心管，先加入一定量分离液；随后将管子小心地倾斜45度，并沿着壁管缓慢地加入血液样品，使样品顺着管壁缓慢滑动到接近分离液液面处，避免血液样品冲入液面下，此时血液样品平铺在分离液的液面上，注意保持两液面界面清晰，切勿搅动液面或摇晃、混匀。

注1：可以使用无菌巴氏吸管(FPIP002/FPIP004/FPIP008)吸取血液样品或后续的血浆层、淋巴细胞。

注2：由于分离液和血液的密度差异，将形成明显的分层界面。如果样品较多导致加样时间较长，在离心前出现红细胞成团下沉属正常现象。

注3：如果使用特殊的外周血淋巴细胞分离管如SepMate™ PBMC Isolation Tube等进行分离，请同时参考该离心管的使用说明进行操作。

- 当样品体积小于3ml时，加入3ml分离液，然后按15ml离心管进行操作；当样品体积在3-20ml范围内时，分别按15ml(步骤c)、50ml(步骤d)两种规格的离心管进行操作。

注1：可将血液样品和分离液置于 20°C 水浴中孵育20分钟，以保证最佳分离温度。

注2：分离液体积不得少于3ml。

- 对于15ml离心管：

(1) 稀释过的血液样品：推荐最佳比例为5ml分离液+4ml稀释后的血液样品；推荐最佳离心条件为 20°C ， $500 \times g$ ，离心25分钟。

(2) 未稀释的血液样品：推荐最佳比例为5ml分离液+5ml血液样品；推荐最佳离心条件为 20°C ， $600 \times g$ ，离心25分钟。

- 对于50ml离心管：

(1) 稀释过的血液样品：推荐最佳比例为20ml分离液+20ml稀释后的血液样品；推荐最佳离心条件为 20°C ， $650 \times g$ ，离心30分钟。

(2) 未稀释的血液样品：推荐最佳比例为20ml分离液+20ml血液样品；推荐最佳离心条件为20°C，600×g，离心30分钟。

e. 条件的优化：

- (1) 根据离心后乳白色环状层(淋巴细胞层)显现状态，调整样品稀释倍数。乳白色环状层弥散，应适当提高样品的稀释倍数；乳白色环状层很浅或没有，应适当降低样品的稀释倍数。
- (2) 根据离心后淋巴细胞存在的分层位置，可适当调整离心力。离心后淋巴细胞在血浆层，适当提高离心力；离心后淋巴细胞在分离液层，则适当降低离心力。
- (3) 若出现红细胞沉降不完全的情况，可以适当加大离心力。
- (4) 若出现血小板污染的情况，可适当降低离心力，同时分离后可增加洗涤次数。
- (5) 离心力的调整以50-100×g为基数，直至达到最佳分离效果。离心力最小不可小于400×g，最大不可大于1200×g。离心时间以20-30分钟为准。
- (6) 地域差异、四季温差及离心机性能差异等均会影响分离效果，可根据实际情况，调整离心条件。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。

f. 血浆层的吸取：小心、缓慢地吸取血浆层并转移到新的离心管中，勿触动PBMC层，可留少量血浆层。血浆层样品后续可用于血浆相关检测。如需获得纯度较高的血浆，建议仅吸取血浆层由上至下的2/3的血浆，剩余1/3血浆可能包含部分PBMC及少量分离液成分。离心后的分离效果示意图请参考图1，由上到下分为四层，依次为血浆层(含血小板)、乳白色环状层(即PBMC层)、透明分离液层和红细胞/粒细胞层。离心后须小心取出离心管，切勿摇晃或震动。

g. 淋巴细胞的吸取：可直接穿过血浆层，小心、缓慢地吸取乳白色环状层(即PBMC层)并转移到新的离心管中(此方法技术要求高)，也可以在尽量吸除血浆层后再小心、缓慢地吸取乳白色环状层，并转移到新的离心管中。

注1：为避免吸取存在分离液交界处的粒细胞，请不要过多吸取淋巴细胞层。

注2：若吸取的淋巴细胞层混杂有红细胞，可使用红细胞裂解液(C3702)将红细胞裂解，以去除红细胞，提高淋巴细胞分离率。

h. 洗涤I：加入10ml PBS或HBSS (C0218)，适当混匀，重悬细胞。250×g离心10分钟，弃上清。

i. 洗涤II：加入5ml PBS或HBSS，适当混匀，重悬细胞。250×g离心10分钟，弃上清。重复本步骤2-3次。

j. 所得沉淀即为分离的淋巴细胞，可加入0.5ml PBS或HBSS或根据后续实验要求加入相应溶液，重悬细胞。

参考文献：

1. Barbara J. Bain. Medicine. 2021. 49(4):183-188
2. Mathur A, Tripathi AS, Kuse M. J Pathol Inform. 2013. 4(Suppl): S15.
3. Sknepnek A, Tomić S, Miletić D, et al. Food Chem. 2021. 342:128344.
4. Udyavar A, Geiger TL. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2010. 58(5):335-46.
5. 王兰兰主编. 医学检验专业必修课考试辅导教材, 临床免疫学和免疫检验, 科学技术文献出版社. 2004年10月第1版, 第111页.
6. Böyum A. Scand J Clin Lab Invest Suppl. 1968. 97:77-89.

常见问题：

由于血液黏度、样品稀释倍数等差异可能产生的问题及解决方案如下表所示。

Problem	Cause	Resolution
离心后淋巴细胞存在于血浆层	离心力过小或离心时间过短	调整离心力
离心后淋巴细胞存在于透明分离液层中	离心力过大或离心时间过长	
离心后乳白色环状层(淋巴细胞层)弥散	样品未稀释或者稀释倍数过低	调整样品稀释倍数
离心后乳白色环状层(淋巴细胞层)太浅或看不见	样品稀释倍数过高	

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
C0025-200ml	人外周血淋巴细胞分离液	200ml
C0027S	大鼠外周血淋巴细胞分离试剂盒	200ml
C0029S	小鼠外周血淋巴细胞分离试剂盒	200ml
C0031S	兔外周血淋巴细胞分离试剂盒	200ml
C0218	Hanks' Balanced Salt Solution	500ml
C0221A	PBS	500ml
C3702-120ml	红细胞裂解液	120ml
C3702-500ml	红细胞裂解液	500ml
ST341-500ml	生理盐水(0.9% NaCl, 无菌)	500ml
ST476	PBS (10X)	500ml