

兔外周血淋巴细胞分离试剂盒

产品编号	产品名称	包装
C0031S	兔外周血淋巴细胞分离试剂盒	200ml

产品简介:

- 碧云天生产的兔外周血淋巴细胞分离试剂盒(Rabbit Peripheral Blood Lymphocyte Separation Kit)是一种基于密度梯度离心原理,简单、快速、高效地从兔外周血、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试剂盒。本试剂盒主要分为外周血淋巴细胞分离液,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。本试剂盒中兔外周血淋巴细胞分离液与兔外周全血近于等渗,和Ficoll-Paque、Ficoll-Hypaque、Histopaque等在使用方法上几乎完全一致。
- 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]。
- 啮齿类动物的淋巴细胞比重稍高于人淋巴细胞[7-8],本试剂盒提供的兔外周血淋巴细胞分离液经过一定的配方优化和改良,和兔外周血近于等渗。通过本试剂盒中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。

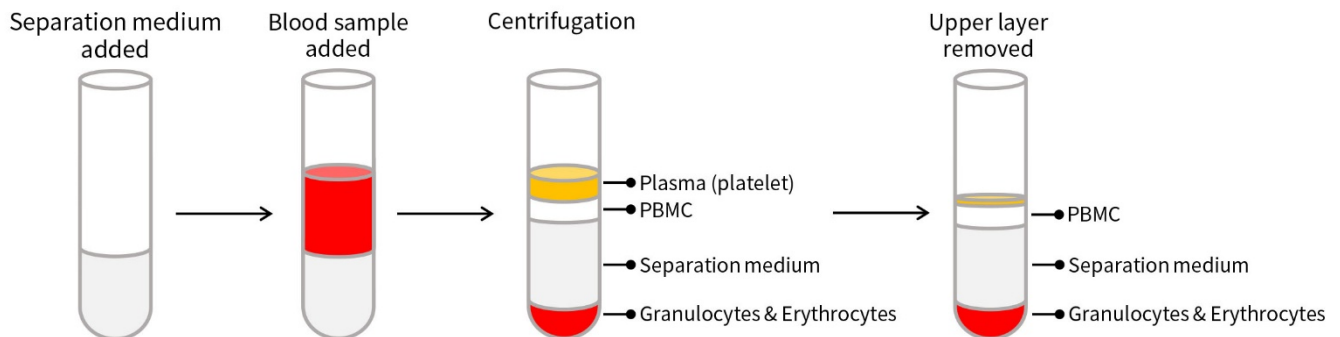


图1. 兔外周血淋巴细胞分离液(C0031)分离兔外周血效果示意图。

- **本试剂盒操作简单,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。本试剂盒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。本试剂盒同时提供高效离心管(15ml)、样品稀释液和清洗液,使用更方便。
- **本试剂盒品质高,质量控制严格。**本试剂盒中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。

- **本试剂盒应用范围广。**本试剂盒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本试剂盒可进行约40次淋巴细胞分离。

包装清单：

产品编号	产品名称	包装
C0031S-1	兔外周血淋巴细胞分离液	200ml
C0031S-2	样品稀释液	200ml
C0031S-3	清洗液	200ml
C0031S-4	高效离心管(15ml)	5支
—	说明书	1份

保存条件：

室温避光保存，两年有效。本试剂盒严禁冷藏或冷冻保存。

注意事项：

- 兔外周血淋巴细胞分离液使用前须颠倒混匀，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。
- 本试剂盒宜室温保存，严禁冷藏冷冻保存。低温条件下，兔外周血淋巴细胞分离液会出现白色结晶，影响分离效果。
- 由于兔外周血淋巴细胞分离液在低温时密度升高，而在高温的时候密度会降低，因此使用本试剂盒的温度要求是18-22℃，最佳分离温度是20℃。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。血液样品宿主的身体状况、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。推荐使用高效离心管(15ml)或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，请选用样品稀释液或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，本产品仅适用于兔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)：

- 可使用本试剂盒中样品稀释液对样品进行稀释，也可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：取一支本试剂盒提供的高效离心管(15ml)，也可使用自备的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。

注4：本试剂盒提供的高效离心管(15ml)使用方法同15ml离心管，但分离效果更好。
- 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℃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×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×g，离心25分钟。
- d. 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×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都会影响分离效果，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清洗液或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清洗液或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清洗液或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.
7. Kim EM, Oh PS, Boud F, Jeong HJ, Lim ST, Sohn MH. *Nucl Med Mol Imaging*. 2020. 54(3):147-155.
8. Dawson HD, Li NQ, DeCicco KL, Nibert JA, Ross AC. *J Nutr*. 1999. 129(8):1510-7.

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

Version 2023.05.31