

人外周血淋巴细胞分离液

货号：RK50036

规格：200mL

◆ 产品简介

本产品利用血细胞密度差异，可高效分离人外周血淋巴细胞，有效去除红细胞、粒细胞等杂质，从而获取活率高、杂质少的单细胞悬液。该单细胞悬液可应用于下游流式分析、单细胞测序、细胞培养及其他细胞相关检测。

◆ 保存与使用条件

(1) 常温保存，不可冷藏或冷冻（长期保存**建议避光**）。

(2) 使用时严格遵守无菌操作（超净台或生物安全柜内），并在 18℃~22℃环境温度下进行操作。

◆ 操作步骤

1. 取新鲜抗凝血（建议血液离体 4 小时内进行分离纯化），使用不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的 PBS（提前恢复到室温）对抗凝血进行稀释，PBS：抗凝血=1:2。

抗凝剂的选择：

(1) 分离出的 PBMC 需要进行进一步细胞培养：选择肝素抗凝剂。

(2) 分离出的 PBMC 无需培养，直接用于检测实验：选择枸橼酸钠抗凝剂。

2. 在无菌离心管中加入适量分离液，然后缓慢加入需分离的抗凝血。**先加分离液，再加血，顺序不能反！**

可 45 度倾斜离心管，然后沿管壁缓慢加入。分离液与血液有密度差，因此会形成明显分层面，切勿吹打、摇晃，破坏分层。

3. 20℃离心，建议升速（开始启动至达到设定离心力）的时间、降速（设定离心时间完成至机器完全停止）时间均控制在 3 分钟左右。

4. 分离液与稀释血样的比例，以及离心条件参考如下：

(1) 4mL 稀释过的血液+5mL 分离液；使用 15mL 离心管；20℃，500g 离心 25min。

(2) 20mL 稀释过的血液+20mL 分离液；使用 50mL 离心管；20℃，650g 离心 30min。

(3) 若血量不足 3mL，则将血样加入到 3mL 分离液中；使用 15mL 离心管；20℃，500g 离心 25min。

5. 离心结束后将出现明显分层，从上到下依次为：

(1) 血浆层

(2) 单个核细胞层（呈环状乳白色）

(3) 分离液层

(4) 红细胞与粒细胞层

6. 小心吸取最上层的血浆层转移到新离心管中（根据实验需要决定是否保留）。然后小心吸取单个核细胞层，转移另一个新离心管中，加入 10mL PBS 吹打混匀，250g 离心 10min。

7. 弃上清，再次加入 10mL PBS 吹打混匀，250g 离心 10min。

8. 弃上清，根据后续实验安排选择相应的 Buffer 重悬细胞，备用。

◆ 注意事项

1 本实验淋巴细胞提取率大于 80%，下表为成年人外周血中各种细胞的数量及比例，供参考：

红细胞	白细胞			血小板
(4-5.5) e9 细胞/mL	(4-10) e6 细胞/mL			(1-3) e8 细胞/mL
	中性粒细胞	淋巴细胞	单核细胞	
	50%~70%	20%~40%	3%~8%	

2 吸取的单个核细胞层混有红细胞：可加入红细胞裂解液进行红细胞裂解。

3 常见问题与解决办法：

出现情况	原因	解决方案
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
目的细胞存在于分离液中	转速过大或离心时间过长	
白环层弥散	细胞密度过大	调整细胞密度
白环层太浅或看不见	细胞密度过小	