

人外周血单个核细胞分离液 (P 1.077)

Cat. No: E-CK-A103

Size: 200 mL

产品编号	产品名称	规格	保存条件
E-CK-A103	人外周血单个核细胞分离液 (P 1.077)	200 mL	RT, shading light
	说明书		1 份

保存条件

本产品可在室温条件下避光保存一年，避免冷藏或冷冻保存。

产品简介

本产品是一种无菌的用于分离人外周血单个核细胞 (PBMC) 的密度梯度分离液，密度为 1.077 ± 0.001 g/mL。外周血单个核细胞 PBMC (peripheral blood mononuclear cell)，主要包括淋巴细胞、单核细胞、吞噬细胞、树突状细胞和少量其他细胞类型，其中淋巴细胞占很大一部分。利用本分离液作密度梯度离心时，人外周血中不同细胞会因其体积、形态和比重(密度)，自上而下分为四层：血浆和血小板 (约 1.030 g/mL) 密度较低，悬浮于分离液的上部，为第一层；单个核细胞 (PBMC，约 1.075 g/mL) 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；第三层为透明分离液层；红细胞与粒细胞密度较大 (约 1.092 g/mL)，沉于底部，为第四层，移去最上层组分就可获得 PBMC。

自备试剂耗材及仪器

1. 试剂：

RPMI-1640 基础培养基、L-谷氨酰胺溶液 (200 mM、100×)、青霉素-链霉素溶液 (100×)、胎牛血清、PBS

2. 耗材：

肝素钠抗凝管、15 mL 和 50 mL 离心管

3. 仪器：

光学显微镜、水平离心机

实验操作指南

1. 用肝素钠抗凝管收集的新鲜人血；

注：收集的新鲜人血尽量在 1 h 内进行 PBMC 分选效果更佳，10 mL 人血大概可分选获得 1×10^7 个 PBMC；全过程样本、试剂及实验环境最好在 $20 \pm 2^\circ\text{C}$ (试剂需要复温) 的条件下进行。

2. 准备 15 mL 离心管，加 5 mL 本试剂 (避免液体挂壁)，再沿管壁缓慢加入 5 mL 新鲜人血 (1: 1 比例，取血液前吹打混匀)；切记加完后不要混匀或晃动管 (如果看见明显分层表明血液新鲜良好)，直接轻放离心机中离心，500 g 离心 20 min；

注：为了降低离心导致的细胞损失，离心机升速不超过 3，降速不超过 2；离完心后，切记不要晃动离心管，

For Research Use Only

缓慢放进超净工作台进行下一步操作。

3. 吸弃一部分最上面一层上清（吸弃 1~2 mL 左右），用 1 mL 枪轻轻吸取第二层上清及少量第三层上清分离液（提高细胞得率）收集到同一管 50 mL 离心管中；
4. 加 1640 基础培养基，混匀离心 250 g，5 min，洗涤 1 次；
5. 弃上清，留细胞沉淀，

注：一般为灰白色沉淀，若带有红色说明有少量血细胞残留也可直接用或加入适量红细胞裂解液将红细胞裂解即得目的细胞。

6. （可选步骤）重复洗涤 1 次（步骤 4-5）；
7. 用 1640 完全培养基或根据下一步实验要求加入对应液体重悬细胞沉淀。

常见问题及解决方案

现象	可能原因	建议
淋巴细胞层中有红细胞污染	实验条件温度过低	样本及试剂放置到 $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 再进行实验
	离心速度过低	适当增加离心速度
	离心时间过短	适当增加离心时间
淋巴细胞活性和得率较低	温度过高	样本及试剂放置到 $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 再进行实验
	血液样本放置时间过长	使用新鲜血液分离以保证淋巴细胞的活性
有粒细胞等污染	离心机结束时骤停，振动会导致淋巴细胞层和下层细胞混合	设置速度缓降（降速 ≤ 2 ），让离心机缓慢停止。

注意事项

1. 本产品仅供科研使用。
2. 本产品需常温避光保存；本品易感染细菌，需在无菌条件下进行实验操作；避免 4°C 低温或冷冻保存，因为低温下可能易出现白色结晶，影响样本分离效果。
3. 血液使用前吹打混匀，将血液加于分离液上时，要避免冲散分层液面，而要使之形成良好的界面，否则影响分离结果，切记加完后不要混匀或晃动管，直接轻放离心机中离心；
4. 离心机升速不超过 3，降速不超过 2，降低离心导致的细胞损失；
5. 血液样本差异：个体差异，血液样本也有差异。例如：疾病、性别、身体状况等等，可能出现同样血液量分离获得的 PBMC 细胞差异较大或分离效果较差；
6. 血液和分离液按照 1:1 比例，分离液不少于 3 mL；15 mL 离心管总液体体积不超过 10 mL，50 mL 离心管总液体体积不超过 40 mL。

For Research Use Only