

## Lymphocyte Separation Medium 1.084

### 淋巴细胞分离液 1.084

#### 产品信息

产品名称	产品编号	规格
Lymphocyte separation medium1.084 淋巴细胞分离液 1.084	40504ES60	100 mL

#### 产品描述

淋巴细胞分离液 (Lymphocyte Separation Medium 1.084, 简称 LSM-1.084) 是一种无菌的即用型分离液, 基于 Böyum 的 Ficoll-甲泛影钠溶液做过一些改良, 使得操作简单快速且分离效率更高。本品是无菌的聚蔗糖 Ficoll/泛影酸钠混合溶液, 密度为 1.084 g/ml, 内毒素含量很低 (<0.12 EU/mL), 是在严格控制的环境下加工生产的, 生产条件符合 ISO13485:2003 标准和 GMP 认证。相对于密度为 1.077 g/mL 的人淋巴细胞分离液, 本品适用于分离更高密度的人单个核细胞, 包括外周血, 脐带血以及骨髓瘤来源的组织样本。还适用于分离大小鼠血细胞, 正因为啮齿动物的淋巴细胞密度稍高于人淋巴细胞。

#### 工作原理

去纤维蛋白或抗凝人血以 1:1 的比例用无菌生理盐水或平衡盐溶液稀释, 小心的添加在分离液上层 (不要混杂在一起), 之后离心 30-40 min。离心过程中, 差速迁移使其最终形成几个不同的细胞分层:

- ① 聚集在管底的颗粒主要是 Ficoll 聚集的红细胞以及沉淀物;
- ② 紧挨着上面一层的颗粒主要是粒细胞, 其处于 LSM-1.084 溶液的渗透压临界, 具有足够高的密度迁移穿过 LSM-1.084 溶液层。
- ③ 单个核细胞分布在血浆和 LSM-1.084 分离液的中间层, 还包括一些沉降系数低 (密度低) 的颗粒, 如血小板。

淋巴细胞, 单核细胞和血小板不具有足够高的密度穿透 LSM-1.084 分离液层, 因此这些细胞在血浆和 LSM-1.084 分离液层聚集形成一个中间分层。吸取中间层, 用平衡盐溶液短暂洗涤, 以除去血小板, 细胞分离介质和血浆, 就可以分离单个核细胞。通常情况下, 分离所得的细胞中 95±5% 为单个核细胞, 细胞存活率 >90%, 回收率为 60±20%。

#### 运输与保存方法

室温运输。

4-30 °C 密闭避光环境下可稳定保存 3 年, 开瓶后需 4-8 °C 保存。

#### 影响单个核细胞分离效果的因素

##### 1. 血液样品保存时间

血液尽可能新鲜且无血块, 为获得最佳分离效果, 最好在取血 2h 内进行实验。血液放置过久可能会降低细胞存活率、回收率, 甚至有可能引入粒细胞和红细胞污染, 放置超过 6h 可能会严重影响分离效果。

##### 2. 血液体积

血液量和管径决定样本在管子中的高度, 以及后续的离心时间。提高离心管内的血液高度会引入红细胞污染的可能。但是分离效率不会明显受管径的影响。因此, 对于体积大的血样, 建议可在保持离心时间不变的情况下选择更大直径的离心管。

##### 3. 红细胞去除

单个核细胞分离的产量和纯度与红细胞是否去除干净有关。

若全血中红细胞发生凝集会导致一些单个核细胞也被聚集在内, 从而在离心后被沉降在红细胞层内。可通过稀释全血的方法来避免此现象。温度大小会影响红细胞的凝集, 18°C 条件能提供最佳的分离效果。若温度升高 (如 37°C) 会提高红细胞凝集的可能, 降低分离效果。低温 (4°C) 环境红细胞聚集可能降低, 需要增加离心时间。提高离心时间到 5-10 min 能减低红细胞污染。

#### 4. 血小板污染

对于血小板要求较为严格的分离实验，使用 4-20% 的蔗糖梯度层加在 LSM-1.084 溶液层上方，再次离心以去除所有的血小板。离心后，血小板分布在蔗糖溶液上方，单个核细胞穿过蔗糖溶液停留在 LSM-1.084 溶液上方。

#### 操作方法

##### 1. 材料准备

- 1) 样本体积 (4 mL 总体积): 取 2 mL 的去纤维蛋白或抗凝血，将其与等体积 (2 mL) 的无菌盐溶液以 1: 1 比例混合。**注:** 大体积的血样可以得到相同的分离效率，只需要选用更大直径的离心管，以维持血样的高度 (约 3 cm) 和 LSM-1.084 溶液的高度 (约 2.4 cm)。
- 2) LSM-1.084 分离液，使用前需放到室温环境下温度平衡 10-30 min;
- 3) 平衡盐溶液: 用做稀释和清洗液，建议直接购买商业化的盐溶液。也可以使用其他溶液，如不含  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  的磷酸盐溶液 (如 DPBS 溶液), Hank's, 或者细胞培养液 (如 RPMI 1640)。

##### 2. 分离单个核细胞

- 1) 取 2 mL 的去纤维蛋白或抗凝血，将其与等体积 (2 mL) 的无菌盐溶液以 1: 1 比例混合，于 10-15 mL 离心管中颠倒混匀，或用枪上下轻轻吹打数次以至混匀。

**注:** 肝素、EDTA、柠檬酸钠、ACD、CPD 抗凝皆可。去纤维蛋白血不需要抗凝剂。

- 2) 使用前轻轻颠倒瓶子使 LSM-1.084 充分混合，用注射器或枪头无菌条件转移 3 mL LSM 到 10-15 mL 离心管中。
- 3) 小心将稀释血液加入 3 mL LSM-1.084 (室温即可) 的上层，使得在血液和 LSM 间形成一个明显的分层。**不要将稀释血液混入 LSM-1.084 中**，如图 1。

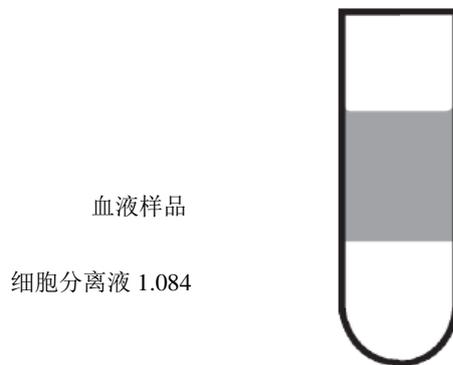


图 1 加样后分层示意图

- 4) 室温下  $400 \times g$  离心 30-40 min，离心可以沉淀红细胞和多形核白细胞，同时可以在 LSM-1.084 上形成一层单核-淋巴细胞分层，如图 2 所示 (从上到下，依次分为血浆层-单个核细胞层-LSM-1.084 层-粒细胞-红细胞)。
- 5) 用无菌枪头吸掉单个核细胞层 (含淋巴细胞和单核细胞) 上方 2-3 mm 的血小板/血浆，小心操作勿吸入单个核细胞层内破坏其平衡 (如图 2)。

**注：**也可以不用先吸走血浆层，直接用枪吸取单个核细胞层。另外，上层血浆不含细胞，也可以留作他用。

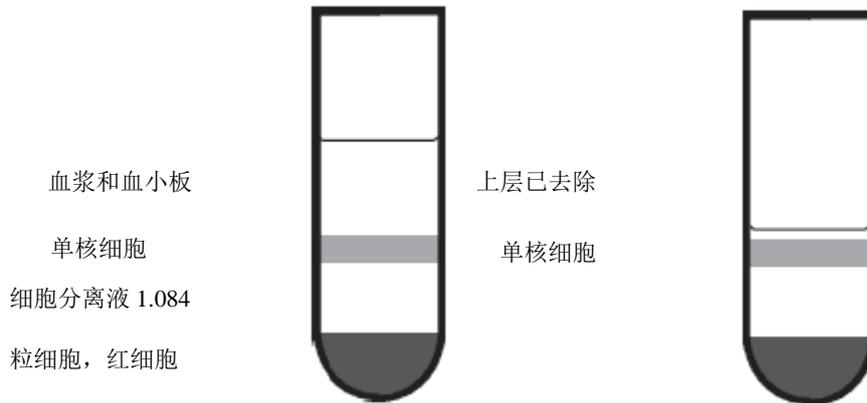


图 2 吸除上层血浆和血小板前后分层示意图

6) 用无菌枪头将单核细胞层转移入一个新的无菌离心管。

**注：**一定要吸取所有的单个核细胞中间层，以及少量上方的血浆液和下方的 LSM-1.084 分离液。

7) 预估转移后的单个核细胞量，加入至少 3 倍体积（约 6 mL）的平衡盐溶液于上述离心管中。

8) 使用枪头上下轻轻吹打将单层细胞溶液充分悬浮。

9) 室温  $400-500\times g$  离心 10-15 min。

**注：**高速离心有助于提高单个核细胞的回收率，但如果需要彻底去除血小板，则推荐低速离心（ $60-100\times g$ ）。

10) 去除上清，加入 6-8 mL 平衡盐溶液重悬单核细胞。

11) 室温  $400-500\times g$ （或者  $60-100\times g$  去除血小板）离心 10 min。

12) 去除上清，用适当培养基重悬单个核细胞备用。

### 3. 分离粒细胞

1) -6) 同上方单个核细胞的分离步骤。

7) 小心吸除 LSM-1.084 层，注意切勿吸入粒细胞层。

8) 转移暴露在表面的白色粒细胞层（位于红细胞层上方）于一个无菌的 50mL 离心管。

9) 加入至少 5 倍体积的平衡盐溶液重悬粒细胞，于  $400\times g$  离心 15 min。

10) 吸除上清，加入 6-8 mL 平衡盐溶液重悬粒细胞，于室温  $400-500\times g$  离心 10 min。

11) 吸除上清，用适当培养液重悬粒细胞备用。

### 注意事项

1) 稀释去纤维蛋白血液或肝素化血液用的盐溶液为无菌液体。

2) 为保持淋巴细胞的活性，应该采血后尽快进行分离。分离细胞层实际上是单个核细胞层，包括淋巴细胞和单核细胞。

3) 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作；

4) 本产品仅作科研用途！