人&各种动物外周血内皮祖细胞分离液实验方法

人血液样本选择

每个人都是一个单独个体，血液样本也有差异。例如：疾病、药物、性别、身体状况、经期等等。

有些病人血液样本可能出现分离效果较差（部分女性分离不好），目前原因不明确。

预实验标准选择成年健康男性样本。

实验动物选择：绵羊不适用于本试剂盒。

技术文档编号：TBD0044SOP

【产品规格】

2×200ml/Kit

【产品组成】

为方便广大用户使用，试剂内容如下：

	名称	产品编号	规格
A	分离液 1		200ml
B	分离液 2		200ml
C	清洗液（赠品）	2010X1118	200ml
D	说明书		1 份

【实验前准备】

1. 适用仪器

最大离心力可达 1200g 的水平转子离心机。

（离心机使用时调整为慢升慢降（具体参数请咨询离心机厂家）建议升速（指开始启动→达到设定离心力）的时间、降速（指设定离心时间完成→机器完全停止）**时间均控制在 3 分钟左右**。）

2. 抗凝剂的选择

在动物实验采血时，很多实验者选择医用真空采血管获得抗凝血，医用采血管中的抗凝剂只考虑血浆质量，但不利于高纯度细胞分离实验（或必须使用枸橼酸钠的医用真空抗凝采血管）。

为此，天津灏洋特别开发出专用实验动物抗凝剂及抗凝管专用于细胞分离，改变使用普通采血管获得抗凝血分离效果不佳，提取率及纯度低下的不良结果。

序号	产品名称	产品货号	规格
1	TBD™细胞分离专用抗凝剂	TBDTM-0050	100ml
2		TBDTM-0200	200ml
3		TBDTM-0500	500ml
4	TBD™实验动物一次性使用负压采血管（随试剂盒附赠 5 支）	TBDTM-0001	5ml/支

3. 无菌硅化离心管

序号	产品名称	产品货号	规格
1	无菌硅化离心管/10ml（随试剂盒附赠 5 支）	TUB2015	100 支/包

4. 目的细胞最佳分离时间

血液离体后 2 小时内。如达不到 2 小时内分血条件，请务必于 4 小时内进行分血步骤，超过 4 小时很难顺利进行分离。

血液离体时间	分离效果
2 小时内	最佳
2-4 小时	可接受
4-6 小时	细胞活性下降，分离效果不佳
6 小时以上	分离效果极差，直至分离不出细胞

5. 分离液的使用环境

a. 分离液需常温（15℃-25℃）避光保存，严禁冷藏冷冻保存；

b. 使用时严格**遵守无菌操作规范**（超净工作台或生物安全柜内），并在 18℃-22℃环境温度下进行操作，20℃条件下分离效果最佳。超出此温度范围，有可能使分离液密度发生改变，造成分离效果不佳。

6. 参考值（目的细胞参考范围）

本试剂盒可保证**目的细胞的提取率大于 80%，不是纯度**。如需获得高纯度目的细胞，请配合免疫磁珠分选。本试剂盒可减少磁珠的使用量，减少成本。

【检验方法】

全过程样本、试剂及实验环境均需在 20±2℃（试剂需要复温。夏季 20℃，冬季 23℃。）的条件下进行。

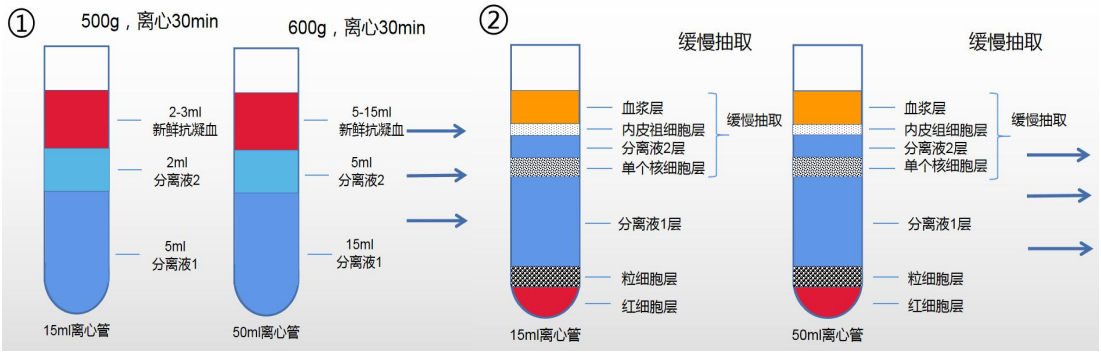
实验方法：方法一如下（不需血浆留存备用）：

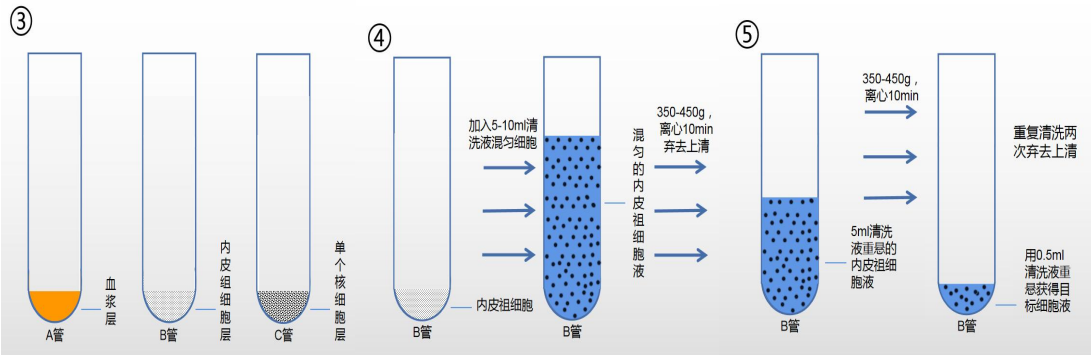
1. 取一支 15ml 无菌离心管，先加入 5ml 分离液 1，后缓慢加入 2ml 分离液 2，形成梯度界面，再缓慢吸取 2-3ml 新鲜抗凝血加于分离液液面之上。各液面分层一定要清晰。或取一支 50ml 无菌离心管，先加入 15ml 分离液 1，后缓慢加入 5ml 分离液 2，再缓慢吸取 5-15ml 新鲜抗凝血加于分离液液面之上。各液面分层一定要清晰。（分离液试剂总量不得少于 4ml，新鲜抗凝血不得少于 2ml。总液体量不得超过 2/3）。

注：两层分离液添加完成后，需要在 1min 内添加血液样本。

2. 以 500g 或 600g，离心 30min（注：如改变血液样本及分离液用量，需相应调整离心力及离心时间。）
3. 离心后，离心管中由上至下分为六层。第一层为血浆层。第二层环状乳白色为（人及各种动物）内皮祖细胞层(第一层白环及上层 50%分离液 2）。第三层环状乳白色为单个核细胞层(下层 50%分离液 2 及第二层白环)。第四层为透明分离液 1 液层。第五层为粒细胞层。第六层为红细胞层。
4. ①小心吸取血浆层转移到新离心管 A 中备用(分离效果不理想，可进行后续处理方案)。
   ②小心吸取离心管中的（人及各种动物）内皮祖细胞层转移到新离心管 B 中。
   ③小心吸取离心管中的单个核细胞层转移到新离心管 C 中。
5. 向含有（人及各种动物）内皮祖细胞层离心管 B 中，加入 5-10ml 清洗液（产品编：2010X1118），混匀细胞。
6. 350-450g，离心 10min。弃去上清。
7. 用吸管吸取 5ml 清洗液（产品编号：2010X1118）重悬所得细胞。
8. 350-450g，离心 10min，弃去上清。
9. 重复清洗两次，弃去上清，用 0.5ml 清洗液（产品编号：2010X1118）或根据下一步实验要求加入相对应液体，重悬所得细胞。

分离图例





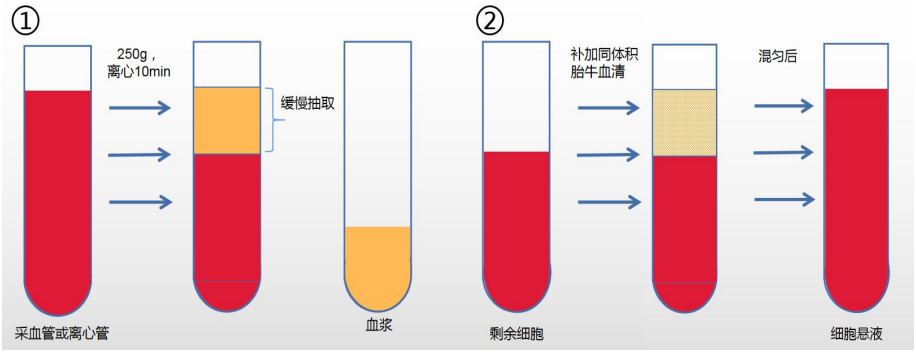
实验方法：方法二如下（需留取血浆备用）：

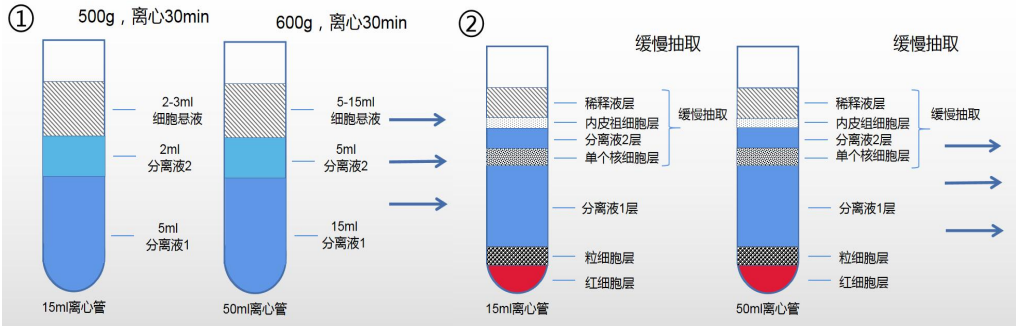
1. 首先取抗凝血，250g，离心 10min，抽取血浆留存备用。补加胎牛血清(添加量与留存血浆量等同) 制成细胞悬液，根据细胞悬液液体体积，选择适当离心管进行试验。
2. 取一支 15ml 无菌离心管，先加入 5ml 分离液 1，后缓慢加入 2ml 分离液 2，形成梯度界面，再缓慢吸取 2-3ml 细胞悬液血加于分离液液面之上。各液面分层一定要清晰。或取一支 50ml 无菌离心管，先加入 15ml 分离液 1，后缓慢加入 5ml 分离液 2，再缓慢吸取 5-15ml 细胞悬液血加于分离液液面之上。各液面分层一定要清晰。（分离液试剂总量不得少于 4ml，细胞悬液不得少于 2ml。总液体量不得超过 2/3）。

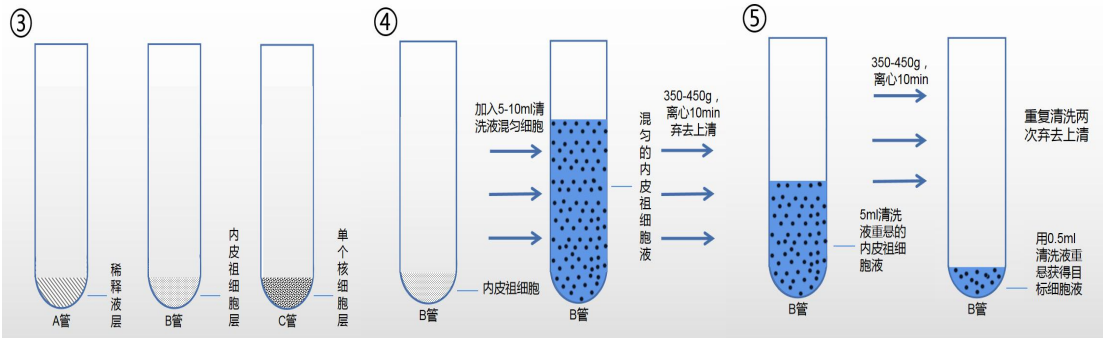
注：两层分离液添加完成后，需要在 1min 内添加血液样本。

3. 以 500g 或 600g，离心 30min。（注：如改变血液样本及分离液用量，需相应调整离心力及离心时间。）
4. 离心后，离心管中由上至下分为六层。第一层为稀释液层。第二层环状乳白色为（人及各种动物）内皮祖细胞层(第一层白环及上层 50%分离液 2)。第三层环状乳白色为单个核细胞层(下层 50%分离液 2 及第二层白环)。第四层为透明分离液 1 液层。第五层为粒细胞层。第六层为红细胞层。
5. ①小心吸取稀释液层转移到新离心管 A 中备用(分离效果不理想，可进行后续处理方案)。
   ②小心吸取离心管中的（人及各种动物）内皮祖细胞层转移到新离心管 B 中。
   ③小心吸取离心管中的单个核细胞层转移到新离心管 C 中。
6. 向含有（人及各种动物）内皮祖细胞层离心管 B 中，加入 5-10ml 清洗液（产品编号：2010X1118），混匀细胞。
7. 350-450g，离心 10min。弃去上清。
8. 用吸管吸取 5ml 清洗液（产品编号：2010X1118）重悬所得细胞。
9. 350-450g，离心 10min，弃去上清。
10. 重复清洗两次，弃去上清，用 0.5ml 清洗液（产品编号：2010X1118）或根据下一步实验要求加入相对应液体，重悬所得细胞。

分离图例







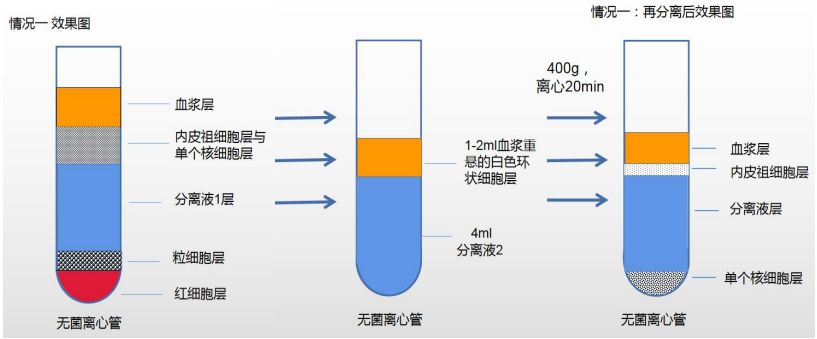
【分离过程中可能出现的情况及处理方案】

情况一：内皮祖细胞层和单个核细胞层混在一起不能分开

1. 吸取全部白色环状细胞层，清洗后用备用的血浆 1-2ml 重悬细胞。
2. 使用分离液 2 重新提取内皮祖细胞。
3. 取 15ml 离心管，加入 4ml 分离液 2，将用血浆重悬的 1-2ml 细胞缓慢加于分离液之液面上，400g，离心 20min。
4. 离心后，离心管可分为 4 层，第一层血浆层，第二层内皮祖细胞层，第三层分离液层，

第四层单个核细胞层。

5. 可重复检验方法中的目的细胞洗涤方法，获得内皮祖细胞。



【注意事项】

1. 全过程样本、试剂及实验环境均需在 20±2℃（夏季 20℃，冬季 22-25℃）的条件下进行。为获得最佳的实验结果，最好在取血 2h 内进行实验，血液存放时间越长，细胞分离效果越差。血液放置超过 6h 后分离效果更差甚至不能达到分离目的。
2. 本实验最好不使用高聚合材质（如聚苯乙烯）的塑料制品，应使用无静电、低静电离心管及未经碱处理过后的玻璃制品，因为静电作用将导致细胞贴壁、碱处理的玻璃表面会变成毛面，影响细胞分离效果。
3. 分离液用量大于血液样本时，分离效果更佳。
4. 吸取过多的目的细胞层上层溶液会导致血浆蛋白及血小板混杂。
5. 如实验后细胞得率或活性过低，请联系天津灏洋技术支持以寻求帮助，具体联系方式详见下方生产企业信息。

【储存条件及有效期】

常温保存，有效期 2 年。本品易感染细菌，需无菌条件操作。无菌条件下操作，启封后置常温保存。如 4℃保存，本分离液易出现白色结晶，影响分离效果。

【参考值（参考范围）】

本实验内皮祖细胞提取率大于 80%。

下表为成年人外周血中各种细胞的数量及比例，用户可适当进行参考。

	红细胞	白细胞			血小板
含量（个/L）	（4.0-5.5）×10^{12}	（4.0-10.0）×10^{9}			（1.0-3.0）×10^{11}
		中性粒细胞	淋巴细胞	单核细胞	
		50%-70%	20%-40%	3%-8%	

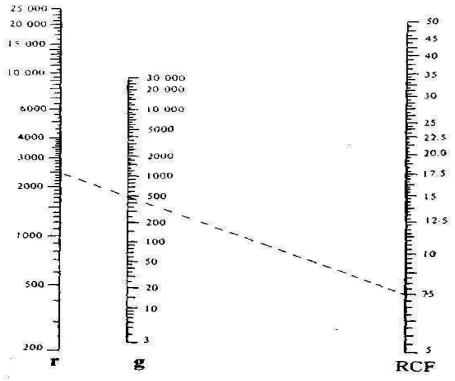
【可能存在的问题及解决方法】

1. 由于血液粘度、细胞密度等差异可能造成的问题及解决方案如下表所示：

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

2. 离心力公式

单位 **rpm** 与 **g** 的换算：



离心速度和离心力的换算
换算法：在 r 标尺（单位 rpm）上取已知转速，在 RCF 标尺上取已知的离心半径（单位 cm），将这两点作一直线相连，直线所通过的 g 标尺上的交叉点即为相应的离心力。

3. 本分离液分离细胞的原理为密度梯度离心，其密度与温度、大气压等密切相关。不同地区客户可根据当地情况对离心条件进行适当调整。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。
4. 本分离液依照国际标准，全部使用药用级原料，性能指标与国产同类产品略有不同，可能出现红细胞沉降不完全的情况，可以适当加大离心转速。

注：在对离心条件进行调整时，离心转速的加减以 50-100g 为基数，直至达到最佳分离效果，离心力最小不得小于 400g，最大不得大于 1200g。离心时间以 20-30min 为准。