

血细胞分离技术

采血

(一) 材料与试剂

1. 抗凝剂

(1) 肝素：肝素是含硫酸基的粘多糖，常用其钠盐或钾盐，它能阻止凝血酶原转化为凝血酶，进而抑制纤维蛋白原形成纤维蛋白，从而阻止血液凝固。常用的肝素溶液浓度为 1 000U/ml，市售肝素多为 100U~126U / mg。

(2) 乙二胺四乙酸 (EDTA)：是一种螯合剂。用生理盐水配制成 4% 的溶液备用。

(3) 阿氏液 (Alsever 液)，配方如下：

枸橼酸钠 ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.80g
枸橼酸	0.0325g
葡萄糖	2.05g
氯化钠	0.42g
H_2O 加至	100.00ml

混匀溶解后，114.3℃ 高压蒸汽灭菌 10min 备用。

阿氏液中既含有枸橼酸钠抗凝剂，又含有细胞生存的营养，所以它既可做抗凝剂，又可做血细胞的保存液。

2. 针头 根据不同动物和采血部位，采用不同型号的针头，用前必须灭菌或消毒。

3. 采血容器 注射器或三角瓶等。

4. 采血动物。

(二) 操作方法

1. 采血法 各种动物采血方法不一。马、牛、羊等大动物一般从颈静脉采血，猪从颈静脉、前腔静脉或耳静脉采血，家禽由翼下静脉或心脏采血，兔由心脏或耳静脉采血，犬由颈静脉或四肢静脉采血，豚鼠由心脏采血，小白鼠则可断尾或剪断腋下血管或剪断眼球采血。

2. 抗凝 采集血液最关键的问题是抗凝，采用什么方法进行抗凝，则根据实验的要求和条件而定。最常用的方法如下：

(1) 肝素抗凝：采血时，使每 ml 血液含 15U~20U 肝素即可。计算采集的血流量，按 1 000U/ml 的量加入肝素，直接放入采血容器中，采血时，边采血边轻轻摇动，使抗凝剂和血液混匀。对于采少量的血液或小动物采血，可直接用注射器抽取一定量的肝素液，再采血直接抗凝。

(2) EDTA 抗凝：采血前，用灭菌生理盐水将 EDTA 配制成 4% 溶液，然后按预采血液的量，以每 ml 血液加入 1mg~2mg 的 EDTA 的液体量于采血容器内。采血，并不断摇动采血容器，使之混匀。

(3) 玻璃珠法：预先将适量的玻璃珠（根据采血量多少而定）清洗后，装入采血容器中，灭菌后备用。采血过程中，边采边摇采血瓶，以使小玻璃珠在血液中滚动，以机械地除去纤维蛋白，使血液不能凝固。本法虽较麻烦，但对淋巴细胞的活性影响最小，且可减少血小板的混杂。

(4) 阿氏液采血：以阿氏液和采血量以 1:1 比例采集血液，边采边轻轻摇动采血瓶，使之混匀。用阿氏液采血，除了抗凝外，多用于红细胞的保存。一般在 4℃ 条件下，阿氏液中保存的红细胞 2 周其活性和特性不变。

2. 3%的明胶液 称取明胶 3g, 溶于 0.9%的灭菌生理盐水, 终体积 100ml, 114.3℃ 高压灭菌 10min, 冷却后 4℃ 冰箱保存, 临用时 37℃ 预热 10min。

3. Hank' s 液。

(二) 操作方法

1. 取抗凝血, 自然沉降, 如是马属动物的血液, 可直接直立试管架上, 让其自然沉降 1h, 取上层血浆。如是牛、羊血液, 由于其血沉速度非常慢, 可加等量 3% 明胶液, 混匀后让其自然沉降, 1h 后取上层血浆。
2. 2 000r/min 离心 10min, 弃上清。
3. 沉淀用 Hank' s 液混悬后, 再 2 000r/min 离心 10min。
4. 重复步骤 3 一次, 再用细胞营养液将白细胞制成悬液。此液含有整个白细胞群, 包括粒细胞、淋巴细胞、单核细胞和部分红细胞。可供白细胞计数用。
5. 取 2ml 细胞分层液于离心管内, 同时用毛细吸管吸取约 2ml 的血浆 (自然沉降 1h 的上层血浆) 轻轻加入分层液上, 直接加抗凝血也可。
6. 以水平转子离心机 2 000r/min 离心 20min。离心后, 可见分成多层, 最下层是红细胞, 中间层是分层液, 最上层是血浆。在血浆层与分层液之间是一薄层较致密的白色层, 即为单个核细胞层。
7. 用毛细吸管插入到单个核细胞层并吸取该层, 放入另一试管中。
8. 以 Hank' s 液洗涤、离心, 最后配制成适当的白细胞浓度。必要时可计数。

(三) 注意事项

1. 血浆或血液加入分层液中时要小心, 缓慢不要打乱液层、不要摇动。也可以将分层液加入到血浆的上层。
2. 保持淋巴细胞的活性是非常重要的, 所以一般情况下, 是现采血, 马上进行分离。
3. 经过分层液分离的淋巴细胞层, 实际上是单个核细胞层, 包括单核细胞, 不包括粒细胞。欲分离出纯的淋巴细胞, 则按下法除去单核细胞, 或收获单核细胞。

T 淋巴细胞的分离技术

(一) 原理

混合单个核细胞悬液在通过尼龙毛柱时, B 细胞、浆细胞、单核细胞和一些辅助细胞被选择性粘附于尼龙毛上, 而多数 T 细胞则通过尼龙毛柱, 这是获得富含 T 细胞群的有效方法。

(二) 材料及试剂

1. 尼龙毛 (Femwall Laboratories, LP-1 Leukoqak leukocyte Filters)。
2. 烧杯、铝箔、漏斗、一次性手套等。
3. 装填尼龙毛柱, 一次性注射器。
4. 取自然沉降的上层血浆, 过聚蔗糖—泛影葡胺分层液后, 获取的血浆和分层液之间的单个核细胞层。

(三) 操作方法

1. 尼龙毛的清洗与干燥

(1) 戴上已经洗去滑石粉的一次性手套, 将尼龙毛 (1 包或 2 包, 每包 35g) 放入烧杯中, 加入蒸馏水或去离子水, 用铝箔盖上烧杯并煮沸约 10min。

(2) 冷却至常温, 倒入漏斗内, 使水滴干。

(3) 重复 (1)、(2) 步骤 6 次。

(4) 将尼龙毛摊在铺有纱布的方盘内, 37℃ 温箱干燥 2~3 天后, 贮藏在带盖的方盘内。

2. 装尼龙毛柱

- (1) 取 50ml 玻璃注射器，拔去注射芯，在注射器头上套一段带夹子的胶管。
- (2) 将尼龙毛梳理，并适当折叠，以适应注射器的直径，填入注射器内，约 20ml 的体积。
- (3) 将填好尼龙毛的注射器连同注射器芯一起包好，高压灭菌。

3. 细胞分离

(1) 将注射器固定在支架上，倒入 37℃ 的细胞培养液，关闭阀门一定时间，然后打开阀门，放掉细胞培养液，以清洗几次尼龙毛，关上阀门。

(2) 将要分离的细胞液用预先加温的培养液稀释成适当的浓度，约 5.00×10^7 个细胞 / ml。

(3) 将细胞液倒入注射器内，使之没过尼龙毛柱。盖上注射器，37℃ 温育 45min 至 1h。

(4) 打开下口，缓慢放流 (1 滴 / min)，收集于离心管中。

(5) 离心，即获所需的 T 淋巴细胞。

(6) 关闭注射器下口，于注射器内加入 0.85% 冰冷生理盐水，振荡，并套上注射器芯，打开下口，使劲推出注射器内液体，即获得粘附于尼龙毛上的 B 淋巴细胞、浆细胞、巨噬细胞等。

(四) 注意事项

1. 此种分离法，T 淋巴细胞也常有一部分被吸附，吸附的多少与尼龙毛的质量有关，与装柱的松紧也有关系。
2. 此法的 T 淋巴细胞的回收率约 20%~30%。
3. 用过的尼龙毛可回收，以盐水洗涤，然后浸入 0.1mol/L 的 HCl 中过夜，然后再同前法清洗。

资料提供：



cence[®]

全称：长沙湘仪离心机仪器有限公司

湖南湘仪实验室仪器开发有限公司

生产地址：湖南望城台商投资开发区湘仪工业园

联系人：卢一红

手机：13874972826

电话：0736-2842826/0731-2842825

传真：0731-2842829

邮编：410205

客服 QQ：784757816

网址：<http://www.xiangyilxj.com>

E-mail：service@lxjxy.com

注：如没有特殊说明，本公司所提供资料均从互联网搜集所得，故不对资料内容负任何责任