

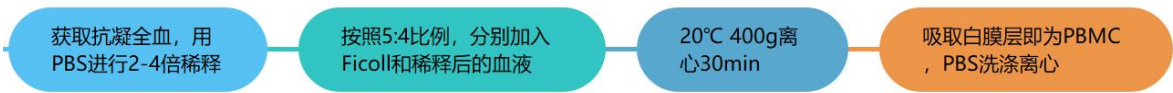
外周血 Ficoll 提取 PBMC 样本制备方案

一、耗材与试剂

表 1 外周血 Ficoll 部分试剂耗材参考表

材料	试剂	设备
15/50 mL 离心管	1×PBS 缓冲液	血细胞计数板
10 mL 移液管	淋巴细胞分离液	电动移液器、1 mL 枪头
5 mL 流式管	细胞染色缓冲液	高速离心机
		涡旋仪
		4℃冰箱
		流式细胞仪

二、实验流程图



三、实验步骤

(1) 实验前准备

试剂提前 1 h 准备：Ficoll 提前 1 h 取出，在室温充分平衡并颠倒混匀。

(2) 外周血梯度密度离心（Ficoll）步骤

1. 采集人或鼠的外周血样本于抗凝管中，室温保存，血液样品离体建议 2 h 内处理效果最佳，若无法及时处理，4℃保存，12 h 内处理；

2. 取 15 mL 离心管，加入 2 mL 血液，再加入 2~4 倍 1×PBS 缓冲液稀释外周血，吹打混匀；

▲ 注意：血液样本越稀释，单核细胞的纯度越好。

3. 取新的 15 mL 离心管中，加入 5 mL 淋巴细胞分离液，将试管稍微倾斜，将稀释的外周血悬液沿着管壁缓慢的加入离心管；

▲ 注意：Ficoll 在使用前需室温充分平衡并颠倒混匀，分离时温度以 18-25℃为宜，不要破坏淋巴细胞分离液和细胞悬液的分界面。

4. 20℃下以 400×g 离心 30 min；

▲ 注意：离心速度设置升速（ACC）1，降速（DEC）1，不能骤停。

5. 离心后取出试管，可以看到不同的分层（如图 1），去除上层血浆层，小心地吸取白膜层（PBMC）到新的离心管中；

6. 加入 3 倍体积的 PBS，和白膜层充分混匀，18~20°C 下以 350×g 离心 10~15 min，小心弃去上清液；
7. 重复步骤 6 一次；
8. 弃上清，细胞染色缓冲液重悬细胞沉淀，并调整细胞浓度至 $5 \sim 10 \times 10^6$ 个细胞/mL，将细胞悬液按照 100 μ L/管分配到 12×75 mm 的流式管中用于后续实验操作；
9. 分选后实验结果图见图 2。

四、Ficoll 效果图

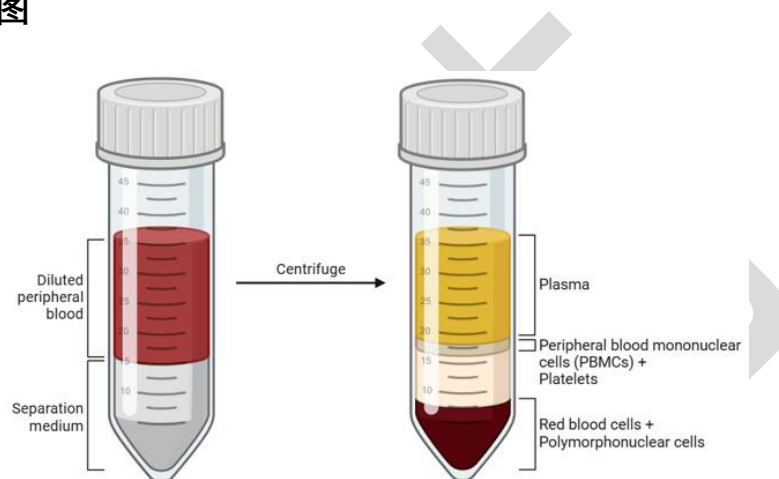


图 1 人外周血 Ficoll 效果图

五、实验结果图

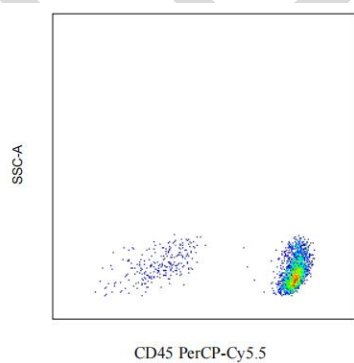


图 2 人外周血 Ficoll 提取效果