

方法 6-4. 从全血中制备红细胞

原理

红细胞由全血离心后移除上清血浆后获得。移除的血浆体积决定了红细胞的压积。当红细胞保存在 CPDA-1 中，在贮存期内保持其最大生存活力需要保存液与细胞有适当的比率。保存于 CPDA-1 的红细胞压积等于或者小于 80%保证了在最多 35 天的贮存期内，红细胞代谢有充足的葡萄糖。

材料

1. 新鲜采集的全血，采血方法遵照方法 6-3。将血液采集在有联袋系统的血袋中。
2. 血浆分离器
3. 金属夹和手压式热合机
4. 器械（剪刀、止血钳）
5. 热合机（可选）
6. 低温离心机
7. 天平

程序

1. 如果不制备富含血小板的血浆，全血采用“重”离心，温度设定为 4℃。重离心通常采用 5000 × g 离心 5 分钟或 5000 × g 离心 7 分钟就足够了（加上减速的时间）。每个实验室必须确定自己的参数。如果要计算相对离心力（RCF）g，可以使用表 6-4-1 的计算公式。如果要制备富含血小板的血浆，全血采用“轻”离心，通常

采用 $2000 \times g$ 离心 3 分钟就足够了（加上减速的时间）。每个实验室必须确定自己轻离心的参数。

2. 将已离心的血袋放置在压浆板上，松开弹簧，使压浆板接触血袋。
3. 用止血钳夹住主血袋和转移袋之间的导管；如果没有闭合器械，就在管路上打个松散的反手结。
4. 如果有两个或两个以上的转移袋，用止血钳让血浆流入其中的一个转移袋。打开主血袋的闭合处。天平可以称量分离出的血浆。去除适量的血浆以达到要求的红细胞压积。也可以使用自动化的分离器。
5. 当要求的上清血浆量进入转移袋后，再次使用止血钳。在两个位置热合主血袋和转移袋之间的管路。
6. 检查主血袋和转移袋上的献血者号码是否一致，并在两个热合口之间分离管路。

说明

1. 如果血液采集到单个血袋中，则按照如下内容修改步骤：在离心之前，用无菌导管连接器将全血血袋连接上转移袋。将血袋放置在压浆板上之后，用止血钳夹住无菌转移袋的导管，将转移袋的套管无菌穿刺入血袋荚膜内，松开止血钳，然后按照上述方法继续操作。但是由于血袋系统开放需要变更有效期。
2. 对 450mL 的全血来说，分离出 230 ~ 256g (225 ~ 250mL) 的血浆，将红细胞保存在抗凝保存液中红细胞压积通常在 70% ~ 80% 之间。相应的，500mL 全血，分离出 256 ~ 281g (250 ~ 275mL) 的血浆，

将红细胞保存在抗凝保存液中红细胞压积通常在 70%~80%之间。

3. 如果使用添加液，可以在第 4 步的时候分离出更多的血浆。在分离血浆之后，让添加液从转移袋中流入红细胞。这个步骤使红细胞压积达到 55%~65%。要确保采用适当的标签和有效期。

方法 6-5. 从全血中制备储存前去白细胞红细胞

原理

采用制备红细胞的常规原理和材料，除了红细胞经过特定的白细胞滤器的过滤。在美国，所有许可的用于红细胞制品的去白细胞滤器都会在一定程度上去除血小板。抗凝全血经过滤之后，只能制备少血小板血浆(PPP)(去除白细胞)和红细胞。但是，食品药品监督管理局(FDA)最近批准了一项不损失血小板的全血去除白细胞滤器。作为选择，红细胞可以在添加液中过滤，这就为制备血小板、血浆和红细胞提供了可能。没有去除白细胞的红细胞仍然要通过无菌连接器连接到去白滤器后流入保存袋内来进行白细胞的去除。

程序

1. 在全血离心前，将抗凝全血倒过来悬挂使血液经重力作用经在线过滤器流入转移袋中。接下来按照方法 6-4 制备 RBC 的步骤[加入添加试剂(AS)，参照说明 3 所述的方法]。
2. 带有滤器的抗凝全血可以直接离心。离心后分离血浆。加入添加液，加入添加液的红细胞按照上述程序 1 通过重力进行。
3. 采用红细胞制备方法制备红细胞成分，可以保存在残余抗凝血浆

或添加液（AS-1，AS-3，AS-5）中，由无菌连接器连接带有在线过滤器的转移袋。过滤可以按照制造商的说明通过重力进行，如步骤 1。过滤的时间通常在采集 24 小时内，最多 5 天，或按照过滤器制造商的说明进行。

4. 去除白细胞的红细胞要标明“去除白细胞的红细胞”。没有特定的标签注明储存前白细胞去除。

说明

1. 如果采集系统本身不含在线滤器，则使用无菌连接器将白细胞滤器连接在血袋系统上。滤器的使用应该遵照制造商的说明。
2. 通常来说，由全血制备的血小板只能在去除白细胞进行之前制备。但是 FDA 认证的不损失血小板的去除白细胞滤器近期成为可能。

方法 6-6. 复壮红细胞

原理

复壮红细胞是一个将贮存的红细胞恢复耗尽的代谢物并提高其功能和输注后存活的一个过程。复壮溶液不是用于静脉输注；溶液温育后，红细胞可以甘油化冰冻保存或洗涤后 1-6℃ 条件下 24 小时内输注。

经食品药品监督管理局（FDA）批准的复壮溶液，含丙酮酸盐、次黄嘌呤核苷、磷酸盐和腺嘌呤。复壮溶液只能用于保存于枸橼酸-磷酸-葡萄糖（CPD）、枸橼酸-磷酸-葡萄糖-葡萄糖（CP2D）或枸橼酸-磷酸-葡萄糖-腺嘌呤（CPDA-1）的全血中分离出的红细胞。此溶液可以在

采血后 3 天至成分到期后 3 天之间的任何时候加入。但是，复壮溶液通常不对贮存期的前 14 天内红细胞进行处理，因为处理后的细胞可能会导致异常水平的 2, 3-二磷酸甘油酸，从而影响携氧能力。

试剂和材料

1. 从采集于 CPD、CP2D 或 CPDA-1 的全血分离出的红细胞，保存于 1 ~ 6℃。在采集后，悬浮于 CPD 的红细胞在 3 ~ 24 天中（或在 CPDA-1 内悬浮 3 ~ 38 天）可以使用。AS-1 红细胞可以复壮，但是只能冰冻保存 3 年。FDA 尚未批准保存在 CP2D、AS-3 和 AS-5 内的红细胞所使用的复壮溶液。但是有文献表明保存在 CP2D AS-3、CPD AS-3 和 CPD AS-5 内的复壮红细胞获得了令人满意的复壮后存活率。
2. 红细胞处理液，装入 50mL 的无菌小瓶，也称为复壮溶液。
3. 防水塑料袋
4. 金属夹和手压式热合机
5. 无菌导管

程序

1. 使用转移装置和无菌技术将红细胞与复壮溶液容器连接。
2. 使 50mL 复苏溶液通过重力流入红细胞。在此过程中轻柔晃动悬液。注意如果复苏溶液是在瓶子里应注意使用无菌导管。
3. 热合血袋附近的管路，将此混合物在 37℃ 下温育 1 小时。干式孵育箱和循环水浴箱都可以。如果使用水浴，应该将其完全没入水中，有必要使用防水外包装来防止污染。
4. 在 24 小时内使用，使用确认过的方法用盐水洗涤复苏红细胞。从

洗涤细胞开始，洗涤后的红细胞储存于 1~6℃，不超过 24 小时。

5. 如果复苏细胞要低温保存，标准的甘油化操作将复壮溶液从处理过的细胞中充分清除。保存期从采血开始为 10 年。
6. 确保血液有效标注并完善相应记录。

注意

由采集于 CPD 的 500mL 全血制备的红细胞在 AS-1 条件下保存 48 天，随后复壮并成功甘油化和去甘油化。在此步骤中，每单位到期的 AS-1 红细胞使用 50mL 的 Rejuvesol 溶液。

方法 6-7. 使用高浓度甘油低温保存红细胞-MERYMAN 法

原理

低温保护剂使红细胞在冷冻状态下长时间（大于等于 10 年）保存成为可能。高浓度甘油特别适合这种目的。对于采集于 450 mL 血袋内的红细胞的使用方法描述如下。

材料

1. 献血者血液，采集于枸橼酸-磷酸-葡萄糖（CPD），枸橼酸-磷酸-葡萄糖-葡萄糖（CP2D），或枸橼酸-磷酸-葡萄糖-腺嘌呤（CPDA-1）或添加溶液（AS）。
 - a. 完成血液冷冻前必要的加工。
 - b. 保存于 CPD、CP2D 或 CPDA-1 的红细胞在冷冻前 1~6℃ 条件下最多保存 6 天。
 - c. 保存于 AS-1 和 AS-3 的红细胞在冷冻前 1~6℃ 条件下可以保存

42 天。

d. 经过复壮的（参考方法 6-6）冰冻前只能保存到原始过期时间后 3 天。

e. 在任何保存溶液中的红细胞而且经过穿刺处理的必须在密封穿刺后 24 小时之内冰冻。

2. 保存袋，可以是聚氯乙烯（PVC）或是聚烯烃血袋。

3. 6.2M 甘油乳酸溶液（400mL）

4. 冰冻用的硬纸板盒或金属盒。

5. 高渗（12%）NaCl 溶液。

6. 1.6% NaCl 1L，用于洗涤。

7. 等渗（0.9%）NaCl 含 0.2%葡萄糖。

8. 37℃水浴或 37℃干浴。

9. 将冰冻于高浓度甘油的红细胞去甘油化，使用不间断流动洗涤或分批洗涤的设备。

10. 冰箱胶带

11. 冰箱（-65℃或更低）

程序

制备准备甘油化的红细胞

1. 从全血中分离出上清抗凝-保存或添加溶液制备成红细胞。将需要冰冻的红细胞称重，得到红细胞净重。红细胞连同血袋的重量应该在 260 ~ 400g。

2. 重量不足的血袋可以通过加入 0.9%NaCl 或者分离出比平时少的

血浆来调节到 300g。记录下重量；如果可行的话，记录下加入 NaCl 的量。

3. 记录全血的号码，ABO 血型 and Rh 血型，抗凝剂，采血日期，冰冻日期，有效期和实验操作人员的信息。如果可以的话，记录下转移袋的批号。
4. 将红细胞和甘油放置在干燥的暖箱内 10~15 分钟或放置在室温条件下 1-2 小时使其至少达到 25℃。温度不能超过 42℃。
5. 将“冰冻红细胞”的标签贴在将要冰冻的袋体上。标签还必须包含冰冻机构的名称，全血号码，ABO 血型和 Rh 血型和失效日期。标签还应包含追溯采血日期，冰冻日期和使用的低温保护剂。

甘油化

1. 记录下甘油，冷冻血袋的批号，如果使用 0.9%NaCl，也要记录批号。
2. 将红细胞放在震荡仪上，在红细胞轻柔震荡的同时加入约 100mL 的甘油。
3. 关掉震荡仪使细胞平衡约 5~30 分钟。
4. 使部分甘油化的细胞通过重力进入冷冻血袋。
5. 将剩下的 300mL 甘油阶梯式慢慢加入，轻柔震荡。小剂量的甘油加入小剂量的红细胞内，最终甘油浓度为 40% w/v。排除袋内空气。
6. 将一些甘油化的细胞流入导管，为分段做准备。
7. 将甘油化的细胞保持在 25-32℃ 下直到开始冰冻。建议从冷藏状态下分离出红细胞到将甘油化红细胞速冻之间间隔不要超过 4 小

时。

冰冻和贮存

1. 将甘油化的血液放置在硬纸盒或金属盒内，放入低于 -65°C 冰箱。
2. 将盒子边缘贴上冷冻标签，标明 ABO 血型, Rh 血型和失效日期。
3. 不要剧烈震荡或搬运已冰冻的细胞。
4. 冰冻速度应小于 10ml/分钟。
5. -65°C 以下保存的冰冻 RBC 最多可以保存 10 年。为了稀有血型血液，医学顾问会希望延长贮存期限。这些非正常血液和使其保存超过 10 年期限的原因必须记录。

解冻和去甘油化

1. 将外包装放在装有冰冻细胞的保存盒外，将其放置在 37°C 水浴或 37°C 干浴。
2. 轻柔地摇动使其加速解冻。解冻的过程至少需要 10 分钟。解冻细胞的温度应该为 37°C 。
3. 细胞解冻后，使用商业仪器来进行批或持续流动洗涤使细胞去甘油化。按照制造商的要求操作。
4. 记录所使用试剂和软件的批号，制造商。把“去甘油化红细胞”的标签粘贴在转移袋上；确保标签应包含采集设备的标识，细胞去甘油化的设备，ABO 血型, Rh 血型，全血条码，失效日期和时间。
5. 使用一定量高渗（12%）NaCl 溶液按照不同血液规格稀释血液。使血液平衡约 5 分钟。
6. 用 1.6% NaCl 洗涤直至去甘油化结束。大约需要 2L 洗涤溶液。检

查剩余的甘油，参照方法 6-9.

7. 将去甘油化的细胞悬浮在含 0.2%葡萄糖的生理盐水（0.9%）NaCl 中。
8. 将细胞充满管路并热合成小份，使之可以进行接下来的相容性试验。
9. 去甘油化的细胞应在 1-6℃下保存不超过 24 小时。（经批准的密闭系统允许去甘油化红细胞在 1-6℃下保存至 2 周。）

注意

1. 如果考虑到将来采用新的献血者筛查实验，献血者的小份血清或血浆应该冻存在-65℃以下。
2. 当采用新的献血者筛查试验，贮存的血样没有为此检测留样，血样应该在标签上标明试验未进行。发放未经检测血样的原因应记录存档。如果献血者样本是在保存后获得并检测，发放的时候样本检测日期应该标明在血袋上。
3. 对保存在AS-1 和AS-3 内 500mL全血制备的去白细胞红细胞进行甘油化和去甘油化是成功的。体内回收率超过 80%，用铬-51 标记的 $T_{1/2}$ 值比这两种添加溶液保存 40 天的值高。调节添加入红细胞的甘油量，使之达到 40% w/v 的浓度。在此计算中，假设每 100mL 甘油中含 57g 甘油。

方法 6-8. 使用高浓度甘油低温保存红细胞-VALERI 方法

原理

采集在含有枸橼酸-磷酸-葡萄糖-腺嘌呤（CPDA-1）的 800mL 血袋中制备成的红细胞在 1~6℃ 下保存 3~38 天可以进行生物复壮，并在 40% w/v 甘油作用下冷冻在原始 800mL 血袋中。红细胞复壮的其他信息参考方法 6-6。

材料

1. 带有四联袋系统的 800mL 原始血袋。
2. 手工密闭夹。
3. 空的 600mL 聚乙烯低温冷冻瓶 [如，Corning 25702 (Corning Incorporated Life Sciences, Lowell, MA) 或 Fisher 033746 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)]
4. 带熔接片的无菌连接器。
5. 冰箱胶带。
6. 600mL 转移袋。
7. 50mL 红细胞处理溶液 (Rejuvesol, Cytosol Laboratories, Braintree, MA)。
8. 可热合的 8" × 12" 塑料袋。
9. 复苏装置 [Fenwal 4C1921 (Fenwal Inc, Round Lake, IL) 或 Cutter 98052 (Cutter Biological, Berkley, CA)]。
10. 无菌空气过滤针 [如，BD Nokor (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)] 只用于 Fenwal 复苏装置。
11. 500mL 甘油 57% 溶液 (Fenwal 4A7833) 或 500mL 6.2M 甘油化试剂 (Cytosol PN5500)。

12. 标签——复苏冰冻红细胞。
13. 硬纸板贮存盒（外部尺寸 7" × 5.5" × 2"）
14. 热合机
15. 外包装塑料袋

步骤

制备甘油化红细胞

1. 在主血袋内采集 450mL 的全血。颠倒血袋，从底部折叠约 2 英寸并用胶带粘贴，将血袋竖直放入离心机。离心并去除所有可见上层血浆。红细胞压积必须为 $75\% \pm 5\%$ 。
2. 将红细胞在 800mL 主血袋内 $1 \sim 6^{\circ}\text{C}$ 保存，通过适配接口连接主血袋和转移袋。
3. 在复壮前离心贮存的红细胞，去除所有可见血浆。红细胞的毛重和净重分别小于 352g 和 280g。
4. 将血浆全部移入转移袋，折叠部分管路，用手工密闭夹夹住（不要有褶皱）。
5. 使用无菌连接器将一个 600mL 空的转移袋连接到主血袋的管路上。
6. 如果需要，将 3 个冷冻瓶内每个放入 1mL 血浆以作后续检测。

细胞的生化修饰

1. 对 Fenwal 复苏设备来说：将 Y 型 Fenwal 耗材的针头无菌穿刺到 50mL 红细胞处理液瓶子的橡皮塞中，并将设备的连接器连接到主血袋的合适位置上。将过滤导管上的针头穿刺入红细胞处理液瓶

子的橡皮塞中。

2. 对 Cutter 复苏设备来说: 将带有滴管腔的白色带孔穿刺物无菌穿刺到红细胞处理液瓶子中, 将不带孔的穿刺物插入原始血袋。
3. 用手轻柔颠倒, 使 50mL 红细胞处理液直接流入红细胞。
4. 将与红细胞处理液连接的管路在适当的端口热合。第二根 Y 型管的管路用来添加甘油 (如下)
5. 将 800mL 原始血袋, 连接的空转移袋, 连接的 Y 型管路完全包裹起来, 在 37°C 水浴下孵育 1 小时。

甘油化

1. 移除已编号的交叉配血管路, 留下连接在主血袋上第一段的留样辫和编号, 血液称重。
2. 按照表 6-8-1 的数值, 在毛重或净重的基础上决定要添加的甘油量。
3. 将复壮管路的连接器无菌插入甘油溶液橡皮塞子的出口端。只有在使用 Fenwal 设备时, 将带过滤管路的穿刺针插入甘油瓶塞子的出口处。
4. 将袋体放在震荡仪上。按照表 6-8-1 的体积要求, 在震荡仪低速 (180 次/分钟) 震荡的条件下首次添加甘油。
5. 将混合物静置平衡 5 分钟, 再次添加甘油。平衡 2 分钟。在有力的震荡下第三次添加甘油。
6. 热合甘油空瓶和最近接口之间的管路。确保转移袋完整地连接在主血袋上。

7. 离心红细胞和甘油的混合物，分离所有可见的上清甘油至转移袋，重新悬浮混匀。要注意此步骤与方法 6-7 的方法有所不同。
8. 在离主血袋 4 英寸的部位闭合管路，取下装有上清液的转移袋并弃去。
9. 粘贴上标明血液成分的标签，设备标签，ABO/Rh 标签。在标签上标明保存期限。
10. 在冰冻之前称重并记录。
11. 在离主血袋顶端（约 2 英寸）的地方折叠血袋。将原始血袋放在塑料外包装袋中并热合外包装袋的袋口，尽量赶走两个袋体之间的空气。
12. 将一小瓶血浆和装有甘油红细胞的塑料袋放入硬纸盒。如果需要的话，将另外 2 小瓶血浆适当标记，保存于 -65°C 以下以便于将来的检测。
13. 在盒子外面粘贴“冰冻复壮红细胞”的标签，ABO/ Rh 标签，设备标签，原始血液号码。单独记录采集日期、冰冻日期和保存期限或粘贴在硬纸盒上。
14. 将血袋置于 -80°C 以下保存。从 4°C 冰箱内取出一直到放入 -80°C 冰冻之间不应超过 4 小时。

解冻和去甘油化

参考方法 6-7。要注意的是，上清甘油要在冰冻之前去除。在去甘油化的过程中只有 2 种盐水溶液。（12%高渗盐水和 0.9%盐水-0.2%葡萄糖溶液）

注意

对保存在AS-1 和AS-3 内 500mL全血制备得到的去白细胞红细胞进行甘油化和去甘油化是成功的。体内回收率超过 80%，用铬-51 标记的 $T_{1/2}$ 值比这两种添加溶液保存 40 天的值高。调节加入红细胞的甘油量，使之达到 40% w/v的浓度。在此计算中，假设每 100mL 甘油中含 57g甘油。

方法 6-9. 检测红细胞去甘油的充分性

原理

将红细胞甘油化来冰冻保存产生了一种高渗透压性细胞内液，此种液体在细胞输注前必须重新恢复到生理学相容的水平。未充分去甘油化的红细胞在做交叉配血时接触到普通盐水、血清或血浆时会发生溶血。在去甘油化过程中，最后加入细胞的溶液是含低浓度葡萄糖的普通盐水。检测甘油去除充分性最简单的方法就是在最后洗涤的时候检测游离血红蛋白水平 (mg/dL)。可以通过将最后洗涤下来的液体颜色与商业比色计做比较来评估溶血。作为选择，可以将普通盐水加入去甘油细胞的留样辩中，上清液的颜色与比色计做比较。

材料和设备

1. 低温贮存红细胞去甘油化的半自动设备。
2. 透明管路，作为去甘油化制备的独立耗材的一部分。
3. 商业用途的比色计。

程序

1. 当最后一次洗涤液经过管路流向废液袋时在中断洗涤。
2. 拿住比色计架子放在管路旁边，并放置在光线良好白色背景前。
3. 记录洗涤液的颜色值，不应比指示 3%溶血（3%红细胞溶血）的管路颜色深。
4. 如果溶血过多，则继续洗涤直至颜色在可接受范围内。
5. 记录单袋血液和质量保证项目的观测结果。
6. 如果重复发生不可接受的溶血，记录纠正措施。

其他去甘油化红细胞的质量控制方法

1. 手提式折射仪：手提式折射仪[如，TS meter, Model 10400A (Cambridge Scientific Instruments, Cambridge, UK)]应该遵照制造商说明来操作。少量的上清液装入检测棱柱内，仪器放置在光源前。折射值应该小于 30 来确保甘油少于 1g%。
2. 渗透压：用于检测渗透压的渗透压计[Fiske Model 2400 (American Instrument Exchange, Haverhill, MA)]应遵照制造商说明来使用。少量的上清液装入渗透压计的槽内，检测样本的渗透压。数值应小于 400 mOsm/kgH₂O 来确保甘油浓度少于 1g%。

方法 6-10. 从全血中制备新鲜冰冻血浆

原理

将血浆从血液细胞成分中分离出来并冰冻以保持不稳定凝血因子。血浆必须在 8 小时内冻存或遵照血液采集，处理和贮存中指示的时间范围来冻存。

材料

1. 按照方法 6-3 新鲜采集的全血，装在联袋（系统）的血袋中。
2. 金属夹和手工闭合夹。
3. 器械（剪刀，止血钳）
4. 电热合机（可选）
5. 压浆板
6. 冷冻设备
7. 低温离心机
8. 天平

程序

1. 将采集后的血液立即重离心（参考方法 6-4 制备红细胞）。除非制备血小板（参考方法 6-13 从全血中制备血小板），使用 1~6℃ 低温离心。
2. 将离心过的主血袋放在压浆板上，将联袋放在天平上归零。将血浆放入联袋并称重。
3. 将转移导管用热合机热合或用金属夹闭合但不要去除管路上的留样瓣号码。将另一个夹子夹住较近的转移袋。
4. 转移袋从主血袋上分离之前，贴上血袋号码。粘贴新鲜冰冻血浆（FFP）成分标签并在标签上记录血浆的体积。
5. 切断两个夹子中间的那段管路。管路可以盘绕或绑在血浆袋上，为需要的检测留取留样瓣。
6. 在采血后 8 小时内将血浆放入 -18℃ 以下保存。

方法 6-11 从全血中制备冷沉淀凝血因子

原理

凝血因子 VIII（抗血友病因子，或 AHF）可以通过新鲜采集的血浆经冷沉淀法浓缩而得。冷沉淀法是一种将 FFP 在 1-6℃ 下缓慢融化的方法。

材料

1. 按照方法 6-10 制备所得 FFP (≥ 200 mL) 放置在至少一个完整的转移袋内。
2. 金属夹和手工闭合夹。
3. 干净的器械（剪刀，止血钳）
4. 电热合机（可选）
5. 压浆板
6. 低温离心机
7. 冷冻装置：适当的冷冻装置包括 1) 能达到 -18°C 以下的气流冷冻机或机械冷冻机 2) 干冰，或 3) 乙醇干冰浴。在 95%乙醇和碎干冰中，15 分钟内就能完成冷冻。
8. $1\sim 6^{\circ}\text{C}$ 循环水浴或冰箱
9. 天平

程序

1. 通过放入 $1\sim 6^{\circ}\text{C}$ 循环水浴或冰箱中将 FFP 融化。如果是在水浴中融化，将袋体包裹塑料袋（或采取其他手段）保持接口干燥。
2. 当血浆融化均匀，可以采取以下步骤来分离液体血浆和冷沉淀凝

血因子：

- a. 将血浆在 1 ~ 6℃ 下重离心（参考方法 6-4 制备红细胞）。颠倒悬挂袋体，使分离出来的血浆迅速流入转移袋，将冷沉淀凝血因子粘附在原来的袋体中。为了防止冷沉淀凝血因子失活或流出袋体，从血浆中分离冷沉淀应该迅速。在冷沉淀融化后应该留取 10 ~ 15mL 的上清血浆在袋体内以便于重悬浮。立即冷冻冷沉淀凝血因子。
 - b. 当约有 1/10 血浆未融化时，将正在融化的血浆放在压浆板上。将袋体竖直放置，使上清血浆缓慢流入转移袋，使漂浮的冰块起到塞子的作用。冷沉淀凝血因子会粘附在袋子或冰块上。当约 90% 冷上清去除后闭合袋体。立即冷冻冷沉淀凝血因子。
3. 在融化 1 小时内冷沉淀凝血因子应该再次冷冻。保存在 -18℃ 以下，最好 -30℃ 以下，从采血之日起最多可以保存 12 个月。

注意

冷沉淀凝血因子 AHF 可以在新鲜冰冻血浆采集之日起 12 个月内的任何时间里进行制备。冷沉淀凝血因子 AHF 的保存期限是从采血之日起 12 个月，而不是从制备时间开始算起。

方法 6-12. 融化合并冷沉淀凝血因子 AHF

原理

冷沉淀凝血因子 AHF 应该在 30 ~ 37℃ 内迅速融化，但是一旦完全融化就不能被复冻。以下方法允许此成分的迅速融化和合并。

材料

1. 37℃循环水浴（融化血浆的水浴是设计干浴装置的厂商设计的）
2. 药物进样口
3. 注射用无菌 0.9% NaCl
4. 注射器和针

程序

1. 用塑料包装袋体防止没有灭菌的水进入，或者使用装置确保袋体竖直，进样口在水面之上。将袋体放入 37℃水浴。
2. 小心并充分混匀融化了的冷沉淀，可以把它挤入剩余的 10-15mL 血浆或添加约 10mL 的 0.9% NaCl 并重新混匀。
3. 通过插入每个袋子的药物注射口来合并。用注射器从一个袋子中抽出并注入另一个袋子。尽可能用越来越多体积的溶解的冷沉淀凝血因子来冲洗随后的袋子，直至所有成分进入最后一个袋子。

注意

1. 融化的输注使用冷沉淀凝血因子 AHF 应该保持在室温。如果为了立即输注而合并，应该在 4 小时内使用。如果为了恢复 VIII 因子，融化的单个单位如果没有开口，必须在 6 小时内使用。合并的冷沉淀不能复冻。
2. 预先合并的冷沉淀凝血因子 AHF 可以由 4~10 单位在最初制备的时候合并，保存期限为 1 年。在冷冻前不能添加任何稀释剂。在制备预先合并的冷沉淀时通常采用开放系统。合并还可以用无菌连接器来完成。但是，使用无菌连接器合并不能延后其保存期限。

一旦融化，贮存前合并的冷沉淀凝血因子 AHF 的保存期限只有 4 小时。与之相比的单个冷沉淀因子的保存期有 6 小时。合并的冷沉淀凝血因子应该在制备 2 小时内冷冻，其保存期限为采血之日起 1 年。与 AABB 标准一致，合并的冷沉淀内必须包含至少 150mg 纤维蛋白原和 80IU 凝血因子 VIII 乘以合并的袋数。合并后的袋子要标明 ABO/Rh 血型。如果其中一袋合并的冷沉淀是 Rh 阳性，则合并单位也必须是 Rh 阳性。融化后的合并冷沉淀不能被复冻。

方法 6-13 从全血中制备血小板

原理

血小板可以由富含血小板的血浆（PRP）方法制备或由白膜法制备。在 PRP 方法中，PRP 由全血轻离心而得，血小板由重离心去除上清血浆而得。在白膜法中，全血经高速离心，而后得到白膜。白膜经低速离心去除红细胞和白细胞得到血小板。两种方法在下面都会介绍。

材料

1. 按照方法 6-3 方法采集的新鲜全血，装入有两个转移袋的血袋内。最终的袋子必须是经过认证的塑料血小板保存袋。在从全血中制备 PRP 之前，将血液放置在室温条件下（20~24℃）。分离过程要在采血后 8 小时内，或在血液采集、处理和贮存中指示的时间范围内。
2. 管路内的滤器（如果制备保存前白细胞去除的成分）

3. 金属夹和手工闭合器
4. 器械（剪刀，止血钳）
5. 压浆板
6. 电热合机（可选）
7. 离心机，按照方法 8-4 校准
8. 天平
9. 震荡仪

制备 PRP 血小板

1. 在制备血小板之前或制备过程中不要将血液冷藏。如果离心机温度是 1-6℃，设置离心机温度控制参数使到 20℃，等离心机温度上升到约 20℃。将血液轻离心（参考方法 6-4）
2. 将 PRP 转移入准备保存血小板的袋子。两次热合原始血袋和 Y 型联袋之间的管路并分离两个热合口。将红细胞放置在 1~6℃。
3. 将 RPR 在 20℃ 条件下重离心（参考方法 6-4 制备红细胞）
4. 将少血小板的血浆转移入第二个转移袋，热合管路。应剩余一些血浆用于血小板保存，但是没有特定的体积。AABB 血库和输血服务的标准要求有足够的血浆留在血小板内使其在整个贮存过程中的 pH 值大于 6.2。贮存在 20~24℃ 中的这个 pH 值通常需要至少 35mL 的血浆，但是 50~70mL 更好。
5. 血小板保存袋应该标签朝下静置在室温条件下约 1 小时。
6. 重新将血小板混匀采取以下方法：

- a. 手工将血小板袋轻轻晃动使其达到均一混匀的状态。
 - b. 将袋子放在室温震荡仪上，轻柔地晃动使血小板在 2 小时内得到混匀。
7. 将血小板保存在 20-24℃ 条件下持续轻轻震荡。
 8. 血小板应该在发放前仔细检查确保没有可见的血小板聚集。

制备白膜血小板

1. 全血在离心前应该保存在 20-24℃ 内。
2. 将全血高速离心 [如, $2800 \times g$ 11.5 分钟, 使用 Beckman J6ME 离心机 (Tritech Inc., Annapolis, MD).]
3. 从袋子顶部去除上清血浆, 手工分离特殊设计袋体底部的红细胞或使用自动化设备。约 50mL 白膜留在袋内。
4. 从 4-6 个单位合并的白膜低速离心 (如, $700 \times g$ 5 分钟, 使用 Beckman J6ME 离心机)。手工或使用自动化设备分离上清 PRP 至血小板保存袋。在分离过程中过滤血小板以去除白细胞。

制备保存前去除白细胞的血小板

保存前去除白细胞 (LR) 的血小板可以通过对全血中得到的富含血小板的血浆 (PRP) 进行过滤制备所得。产生的中间产物是经过过滤的 PRP, 从中可以制备得到 LR 血小板和 LR 血浆。

注意

如果分离和冷冻过程在使用血液采集, 制备和贮存系统规定的时间范围内完成, 上清血浆应该和 FFP 一样速冻保存。制备血小板后得到的 FFP 的体积大体上比直接从全血中制备得到的量少。

方法 6-14. 从血小板中去除血浆（减少体积）

原理

虽然理想的保存血小板条件要求有适当体积的血浆，但是一些患者可能不能承受大容量的输注。可以在输注前立刻离心保存的血小板以去除多数血浆，但是适当的混匀还是必要的。在重新悬浮在剩余血浆之前，血小板必须室温静置 20-60 分钟。输注必须在血小板袋体打开 4 小时内进行。减少体积的操作可以应用于单个或合并血小板。对最佳的离心速度还没有一致的意见。一项研究发现离心 $500 \times g$ 6 分钟有 35%-55% 的血小板损失，与之相比离心 $5000 \times g$ 6 分钟或离心 $2000 \times g$ 10 分钟有 5%-20% 的血小板损失。作者推荐 $2000 \times g$ 10 分钟以避免更大的离心力对塑料保存袋可能带来的冲击。一项由 Moroff 等人所做的研究发现，在 42 单位的血小板中离心 $580 \times g$ 20 分钟，平均血小板损失小于 15%。在理论上涉及到高离心力是因为当力作用于袋体也会破坏血小板，而且也会增加袋体破损的可能性。

材料

1. 单采血小板或按照方法 6-13 从全血中制备得到的血小板。
2. 金属夹和手工闭合器
3. 剪刀，止血钳
4. 热合机（可选）
5. 离心机，按照方法 8-4 校准
6. 压浆板

程序

1. 合并血小板，如果需要的话，使用标准技术移入转移袋。单个血小板对儿科受者来说可能需要减少体积。单采成分可以直接操作。
2. 在 20-24℃ 内离心，使用下列方法的一种：
 - a. 580 × g 20 分钟
 - b. 2000 × g 10 分钟
 - c. 5000 × g 6 分钟
3. 在没有分装之前，将袋子放在压浆板上。从单个血小板中去除所有 10-15mL 血浆，或者稍微更多一点体积，按此比例去除合并血小板或单采血小板中的血浆。
4. 当制品穿刺或合并的时候，在袋体上标记保存期限为 4 小时。
5. 如果离心 580 × g，将袋子静置于 20-24℃ 内 20 分钟，如果离心 2000 × g 或 5000 × g，则静置 1 小时
6. 按照方法 6-13 重新悬浮血小板。

注意

1. 如果使用无菌连接器去除单采血小板或单个血小板内的血浆，那么制品可以认为是无菌的，那么穿刺间隔可以不强制 4 小时的保存期限。然而，没有数据资料支持保存减少体积的浓缩血小板，因此，最好还是尽快输注。
2. 减少体积的浓缩血小板可能不能作为得到许可的制品发放。
3. 合并血小板必须在穿刺 4 小时内使用，不管是不是减少体积。合并血小板可能不能作为得到许可的制品发放。