

EZ-Sep™ Mouse 1X 使用说明书

(070609)

前言:

达科为公司长期致力于在中国推广 ELISPOT 技术。我们不仅仅关注 ELISPOT 检测本身，也同样关注广大客户在完成整个 ELISPOT 免疫学检测期间遇到的各种问题，包括实验样品的制备、样品细胞的冻存与复苏、无血清 ELISPOT 检测、ELISPOT 检测标准化、ELISPOT 检测质量控制、实验数据的读取与处理，等等。

目前的 ELISPOT 检测样品主要有两类来源：一类是血液来源，比如人血或者猴血的 PBMC 细胞；另一类是脾脏来源，主要是取自小鼠或者大鼠的脾脏淋巴细胞。达科公司为了解决这几类淋巴细胞的分离问题，研发出了 EZ-Sep™ (中文商标: ) 系列淋巴细胞分离液。和传统的基于 Ficoll 的分离液不同，EZ-Sep™ 系列淋巴细胞分离液采用了新一代、无毒、低渗的碘化物，所以带来了淋巴细胞分离的革命性变化。本方案将介绍如何使用 EZ-Sep™ Mouse 1X 来获得小鼠脾脏淋巴细胞。

该方法的特点是：操作简单、易学，对实验者的经验要求不高；分离的淋巴细胞的纯度高、状态好、得率高（一个脾脏可达 10^8 个细胞）；实验者在研磨过程中即使产生了很多死亡细胞和细胞碎片，它们对最终的分离效果也没有影响。达科为 EZ-Sep™ Mouse 1X 方法是小鼠淋巴细胞分离方法的重大突破。

产品说明:

EZ-Sep™ Mouse 1X 小鼠淋巴细胞分离液的主要成份为 Iodixanol，分子量为 1550。它是完全化学惰性、无生物毒性的碘化物，不会结合任何已知的生物功能蛋白、不会干扰任何细胞表面膜蛋白、不会抑制酶活性、不会干扰抗原抗体反应。我们实验室做过 Iodixanol 的细胞培养实验，在培养基中加入多达 30% 的 Iodixanol，3 天之内细胞的存活和生长速度没有明显变化。

为了增加细胞在 EZ-Sep™ Mouse 1X 中的活力，我们添加了多种细胞保护成分了缓冲盐（所以，EZ-Sep™ Mouse 1X 的保存温度变为 4℃，而不是室温）。我们实验室的研究表明，小鼠脾脏细胞暴露在该分离液中长达 1 小时，分得淋巴细胞的数量和质量没有明显变化，随后的 ELISPOT 检测结果同其它组完全一致。这说明，即使长时间暴露在 EZ-Sep™ Mouse 1X 分离液中，淋巴细胞的细胞状态也不受影响。

商品名	英文: EZ-Sep™ Mouse 1X 中文: 易得小鼠淋巴细胞分离液
主要用途	小鼠脾脏淋巴细胞分离
次要用途	分离大鼠或者兔子血液中的 PBMC，方法见第四页
规格	100mL/瓶
密度	1.0810±0.0005g/mL(20 °C)
渗透压	280±15mOsm
主要成份	Iodixanol，无化学毒性，无生物毒性
内毒素含量	0.5EU/ml
保存条件	4 °C 避光保存，保持无菌

实验器材

EZ-Sep™ Mouse 1X 淋巴细胞分离液

无菌 35mm 培养皿

200 目尼龙网，裁成 90mm*90mm 正方形，灭菌

10mL 玻璃注射器内活塞，灭菌

不同规格镊子、剪刀若干，灭菌

细胞实验常用器材，如离心管，移液管，加样枪，离心机等

实验方法

1. 断颈处死小鼠，浸入 75% 的乙醇中浸泡 1-2 分钟。
2. 在超净台中小心剪开小鼠的腹部外皮，用大头针固定，再剪开小鼠的腹腔，用镊子取出小鼠脾脏。注意无菌操作。
3. 参考图一，在 35mm 培养皿中放入 4-5mL EZ-Sep™ Mouse 1X 淋巴细胞分离液（使用前摇匀淋巴细胞分离液）。用镊子固定尼龙网，然后用注射器活塞轻轻研磨小鼠脾脏，使得分散的单细胞透过尼龙网进入淋巴细胞分离液中。（每研磨一只脾脏花费的时间最好控制在 5 分钟之内，防止在研磨过程中液体挥发，使得密度与渗透压改变，影响分离效果）
4. 把悬有脾脏细胞的分离液立即转移到离心管中，离心前再覆盖上大约 200uL 的 1640 培养基。

注意：

①离心前在细胞悬液上面加盖一层 1640 培养基，既有利于漂浮上来的淋巴细胞的聚集，又有利于下一步的吸取操作。覆盖层不必太厚，200uL 足矣。

②如果实验者一次实验要处理很多只小鼠，需要注意两点：其一，每研磨完一只小鼠，立即把脾细胞悬液从培养皿转入离心管中，注意盖严管盖，切不可敞口放在超净台中。否则，液体挥发，密度与渗透压都会改变，严重影响分离效果。其二，在所有的小鼠脾脏处理完后，统一再加 1640 覆盖层。如果加早了，两层液体会相互扩散，造成最终离心后的淋巴细胞层下移。

5. 800g 离心 30 分钟。※注意离心设置较慢的加速度和减速度（如果有十档，一般设置在第三档）。离心结束后淋巴细胞会漂浮上来，在 1640 覆盖层下面聚集，细胞分层如图二所示。
6. 吸出淋巴细胞层，再加入 10mL 1640 培养基，250g 离心 10 分钟。倾倒上清液，加入 3-5mL Lympho-Spot™ 无血清培养基重悬，细胞计数。
7. 对获得的小鼠脾脏淋巴细胞进行 ELISPOT 检测或者其它处理。

特别说明

● 关于小鼠脾脏研磨的达科为方法

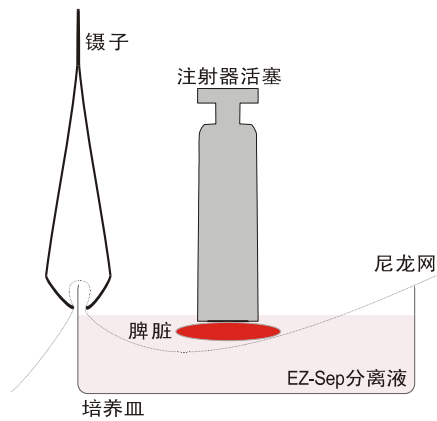
对于研磨小鼠脾脏，不同的实验室有不同的方法，这些方法各有优缺点。有的实验者长期使用某种方法，形成习惯，也能获得很好的实验结果。但是那些方法基本上都需要实验者具备一定的实验经验，新手需要较长的时间学习才能掌握。我们推荐的这种方法（**达科为方法**）非常适合于新手。

其实，新手和熟练者最大的差别在于研磨过程中对力度的掌握。如果研磨的力度过大，脾脏细胞会大批死亡，产生大量的细胞碎片。为了让新手也能掌握研磨过程中的力度，**达科为方法**作了特殊的实验设计。

其一，我们推荐使用尼龙网，而不推荐使用不锈钢网筛，因为尼龙网更柔软一些。

其二，我们推荐使用注射器活塞来研磨脾脏，不推荐使用镊子夹住脾脏研磨，因为镊子夹住脾脏的力度不好控制，容易造成细胞死亡。

其三，这是关键所在，我们利用尼龙网向上的弹力来控制研磨的力度（原理详见图一中的说明）。尼龙网向上的弹力有限，不会伤害到细胞。



尼龙网铺在皿口，用注射器活塞向下按压时，尼龙网向下凹陷，同时产生一个向上的弹力。这个弹力的力度刚好可以把脾脏夹在二者中间，同时又不对脾脏细胞造成伤害。

操作中有两点需要注意：

第一，尼龙网不能接触到皿底，否则就无法控制研磨的力度，容易造成大批细胞死亡；

第二，皿的口径不能太大，否则尼龙网不能产生有效的弹力。经我们验证，35mm 和 60mm 的培养皿可以取得良好的效果，而 90mm 的皿就太大了，尼龙网容易塌陷到皿底。

镊子在一边夹住尼龙网，防止尼龙网在研磨过程中滑动。

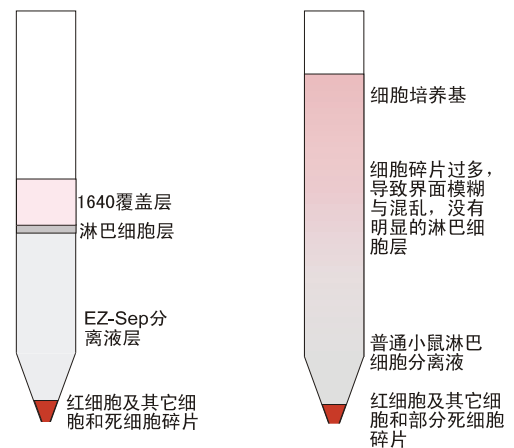
图一、小鼠脾脏研磨的达科为方法

● EZ-Sep™ Mouse 1X 淋巴细胞分离液能有效除去死细胞的原理

普通的小鼠淋巴细胞分离液（通常是 Ficoll 成分）在分离小鼠脾脏淋巴细胞时，一般是在细胞培养基（比如 1640）中将脾脏研磨成单细胞悬液，然后小心翼翼地把细胞悬液铺到分离液上面，要严格保持界面的清晰。这种方法不但对实验者的经验要求高、费时，而且在死亡细胞和细胞碎片大量存在时，很可能分离不到淋巴细胞层。

因为死亡细胞和细胞碎片的密度不固定，在从低密度溶液层（细胞培养基，密度一般为 1.006）进入高密度溶液层（普通小鼠淋巴细胞分离液，密度一般为 1.077-1.082）时，还有一个碎片内外液体扩散、交换的过程，交换程度不同，密度也不同。所以这些密度各不相同的死亡细胞和细胞碎片在经过密度梯度界面时，会把梯度弄混，把界面扰乱。由于没有了明显的密度梯度界面，淋巴细胞就没有办法聚集成层，如图二右所示。

但是，使用 EZ-Sep™ Mouse 1X 淋巴细胞分离液就不存在这个问题了，因为脾脏细胞本身就是在 EZ-Sep™ Mouse 1X 淋巴细胞分离液中研磨的。即使实验者操作不当，产生了大量死亡细胞和细胞碎片（实际上，如果使用小鼠脾脏研磨的达科为方法，即使新手也能避免产生大量的死亡细胞和细胞碎片），这些死亡细胞和细胞碎片内部也会通过扩散很快渗入高密度的（1.0810）EZ-Sep™ Mouse 1X 淋巴细胞分离液，一经离心就会沉积在管底。它们绝不会漂浮上去干扰上面的淋巴细胞层的聚集，如图二左所示。



图二左: EZ-Sep™ Mouse 1X 分离小鼠脾脏细胞的分层示意图。即使死亡细胞和细胞碎片很多，也不影响淋巴细胞的分层；

图二右: 普通小鼠淋巴细胞分离液在死亡细胞和细胞碎片过多时，不能形成淋巴细胞层。

● 能否使用 EZ-Sep™ Mouse 1X 淋巴细胞分离液分离大鼠脾脏淋巴细胞？

可以，但是没有必要分离大鼠的整个脾脏。把大鼠脾脏剪下一小块，研磨与分离的方法与小鼠操作完全一样。

● 为什么我分得的淋巴细胞层非常靠下？细胞层上的液体比当初加入的 1640 要多？

这是由 1640 和分离液部分混合造成的。原因可能来自两个方面：其一，加入 1640 覆盖层的动作过于粗暴，使得二者有部分混合。其二，在加入 1640 覆盖层之后放置了过长时间，没有及时离心，使得二者通过液体扩散而有了部分混合。所以建议在离心之前再加 1640 覆盖层。

● 能否使用 EZ-Sep™ Mouse 1X 淋巴细胞分离液分离大鼠或者兔子血液中的淋巴细胞？

可以，实验方法如下：

1. 取新鲜抽取的大鼠/兔子抗凝外周血 2-4ml。
2. 在超净台中将血液用 1640 稀释一倍。注意无菌操作。

说明：血液稀释之后可以获得更好的分离效果。

3. 在 15ml 离心管中加入 3ml 淋巴细胞分离液。小心地将经过稀释的血液平铺在淋巴细胞分离液液面上层，避免两种液体界面混合。
4. 室温，800g 离心 15 分钟。

注意：离心设置较慢的加速度和减速度（如果有十档，一般设置在第三档）。

5. 离心结束后淋巴细胞会聚集在血浆与分离液的交界面上。吸出淋巴细胞层，加入 10mL 1640 培养基洗涤，250g 离心 10 分钟。
6. 倾倒入上清液，将细胞重悬后进行细胞计数。对获得的淋巴细胞进行相关检测或者其它处理。

易得系列淋巴细胞分离液目前推出四种：

- i. EZ-Sep™ Mouse 1X，即用型，主要用于分离小鼠大鼠脾脏淋巴细胞，也可以分离大鼠或者兔子血液 PBMC；
- ii. EZ-Sep™ Monkey 9X，即用型，用于分离猴子血液 PBMC；
- iii. EZ-Sep™ Human 9X，即用型，用于大量分离人类血液 PBMC；
- iv. EZ-Sep™ Human tube，即用型，用于分离人类血液 PBMC。



是深圳市达科为生物技术有限公司的标志。



以及 **EZ-Sep™**

是达科为公司易得系列淋巴细胞分离液的商标。

如有问题或者建议，请联系我们。

联系人：朱义鑫 博士

电话：0755-26813052 或者免费电话 800 830 4366

电邮：zhu_yixin@dakewe.com

深圳市达科为生物技术有限公司

免费热线(Free Hotline): 800 830 4366

电话(Tel): +86-755-26869146 传真(Fax): +86-755-26869149

网址：www.dakewe.com 电邮：info@dakewe.com