

## 达优<sup>®</sup>小鼠淋巴细胞分离液说明书

Cat#: DKW33-R0100/DKW33-R0400

本品为深圳市达科为生物工程有限公司自主研发的新一代密度梯度分离液。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。

本产品分离的淋巴细胞的纯度高、状态好、得率高；分离方法操作简单、易学，对实验者的经验要求不高。

本实验室的研究表明，小鼠脾脏淋巴细胞暴露在该分离液中长达 1 小时，离心分离后，淋巴细胞的数量和质量没有明显变化，随后的 ELISPOT 检测结果同对照组完全一致。

### 产品信息：

商品名：Mouse 1× Lymphocyte Separation Medium

小鼠淋巴细胞分离液

内毒素：<0.5EU/ml

规格：100ml/瓶

适用范围：分离小鼠/大鼠脾脏淋巴细胞

密度：(1.0810±0.0005) g/ml (20° C)

分离小鼠/大鼠/兔子血液中的 PBMC

渗透压：(280±15) mOsmol/kg

主要成份：Iodixanol，化学惰性，无生物毒性

### 储存方法及保质期：

未开封，4-30 °C 稳定存放，保质期为 1 年；开封后，4-8°C 无菌存放，保质期为 2 周。避免直射光！

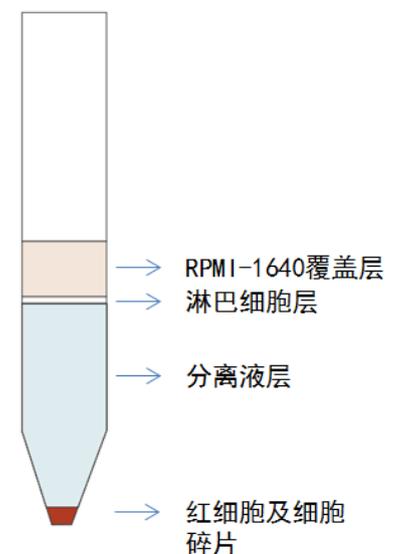
### 使用方法：

自备材料：35mm 培养皿、10ml 玻璃注射器内活塞、200 目尼龙网——  
裁成 90mm×90mm 正方形（以上材料均为无菌要求）、其他常用器材：离心管，移液管，加样枪，离心机等。

### 实验步骤：

1. 断颈处死小鼠，浸泡于 75% 的乙醇中。
2. 在超净台中取出小鼠脾脏。注意无菌操作。
3. 在 35mm 培养皿中放入 4ml-5ml 小鼠淋巴细胞分离液（取用前恢复至室温并摇匀）。研磨（研磨操作请参考图二）。
4. 把悬有脾脏细胞的分离液立即转移到 15ml 离心管中，覆盖 500µl-1000 µl 的 RPMI1640 培养基（保持液面分界明显）。
5. 室温，800g 离心 30min。设置较慢的加速度和减速度，如果有十档，设为第三档。离心结束后细胞分层如图一所示。
6. 吸出淋巴细胞层，再加入 10ml RPMI1640 培养基，颠倒洗涤。室温，250g 离心 10min 收集细胞。

图一：细胞分层示意



7. 倾倒上清液，用无血清培养基或其他培养液重悬细胞，细胞计数。

### 注意事项：

- ☆ 若小鼠饲养时间较长，或者小鼠脾脏异常肿大，导致研磨后细胞悬液呈现暗红色时，须将细胞悬液用小鼠分离液等体积稀释并混匀后，再进行第 4 步操作。
- ☆ 分离液易挥发，每个脾脏的研磨时间应控制在 5min 以内。

### ● 大鼠脾脏淋巴细胞分离操作：

因大鼠脾脏较大，只须剪取一小部分进行实验即可，研磨与分离的方法与小鼠脾脏淋巴细胞的分离操作完全相同。

### ● 小鼠 / 大鼠 / 兔子血液中淋巴细胞分离操作：

1. 新鲜采集的小鼠/大鼠/兔子抗凝血液 0.5ml-3ml 用 RPMI1640 或 PBS 稀释一倍（血液稀释后分离效果更佳，注意无菌操作）。
2. 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。
3. 室温，800g 离心 15min~20min。设置较慢的加速度和减速度（如果有十档，设为第三档）。
4. 后续步骤与小鼠脾脏淋巴细胞分离操作相同。

### 特别说明——关于小鼠脾脏研磨的达科为方法：

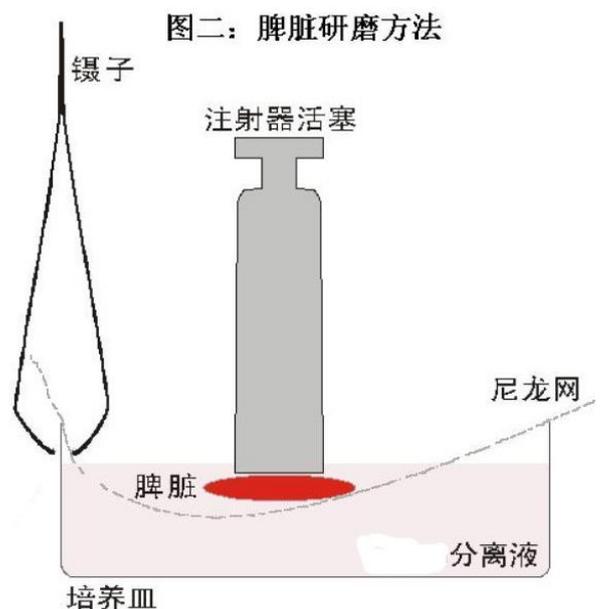
- ☆ 推荐使用尼龙网，因为尼龙网更柔韧。
- ☆ 推荐使用注射器活塞来研磨脾脏。
- ☆ 关键所在，利用尼龙网向上的反弹力来控制研磨的力度。将细胞可能受到的机械损伤降低到最小。

### 注意：

1. 控制研磨力度，使尼龙网保持悬空，避免在皿底上直接研磨而造成大批细胞死亡。
2. 平皿的口径不能太大，否则尼龙网不能产生有效的弹力。
3. 镊子在一边夹住尼龙网，防止尼龙网在研磨过程中滑动。

### 参考文献：

1. Lili Liu, et al. American Journal of Nephrology. 2012; 36(2): 386-396
2. Li Zhang, et al. Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology. 2012; 11(2): 133-145
3. JianHui Xiao, et al. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2012; ArticleID 273435, 15 pages

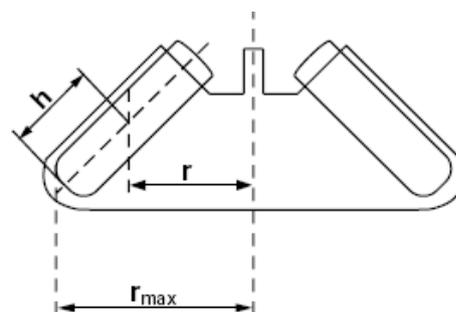


4. SuTing Chen, et al. J Immunol. 2012; 188(2): 668-677
5. Kewei Fan, et al. J Gen Virol. 2012; 93: 987-997
6. C. Qiu, et al. Genetics and Molecular Research. 2012; 11(3): 3236-3245
7. QiaohongMeng, et al. Clinical and Developmental Immunology. 2011; Article ID 831704, 14 pages
8. Xingui Tian, et al. PLoSONE. 2012; 7(7): e41381.
9. Helong Dai, et al. Transplant Immunology. 2011; 24: 195-202
10. Chunwei Shi, et al. Vaccine. 2010; 28(32): 5237-5244
11. Jun Yang, et al. Chinese Journal of Cancer. 2010; 29(4): 359-364
12. Feiyu Wang, et al. Xenotransplantation. 2010; 17: 460-468
13. Ru Wang, Peijie C. Int J Biol Sci. 2009; 5(4): 338-343
14. Fan He, et al. Surgery. 2009; 145(6): 663-674
15. Chunyu Cao, et al. Cellular & Molecular Immunology. 2009; 6: 469-475
16. Ru Wang, Peijie C. Journal of Medical and Biological Engineering. 2009; 29(4): 190-194
17. Juntao Zou, et al. Journal of the Neurological Sciences . 2008; 5: 003-007
18. 殷玉俊, 等. 江苏大学学报医学版. 2008; 18(1): 15-18
19. 秦淑红, 等. 免疫学杂志. 2008; 24(1): 34-37
20. 朱 鹏, 等. 中华微生物学和免疫学杂志. 2007; 27(11): 1046-1049
21. 朱 鹏, 等. 世界华人消化杂志. 2007; 15(31): 3289-3294
22. 刘 义, 等. 生殖与避孕. 2007; 27(11): 691-694
23. 张 慧, 等. 江苏大学学报医学版. 2007; 13(2): 97-101
24. 王晓莲, 等. 实用老年医学. 2007; 21(4): 240-242
25. 丁 隆, 等. 第三军医大学学报. 2007; 29(11): 1072-1075
26. 夏 婷, 等. 中国实验血液学杂志. 2006; 14(4): 745-748
27. 陈华华, 等. 微循环学杂志. 2005; 15(4): 6-8
28. 陈 敏. 重庆医科大学博士学位论文. 2007

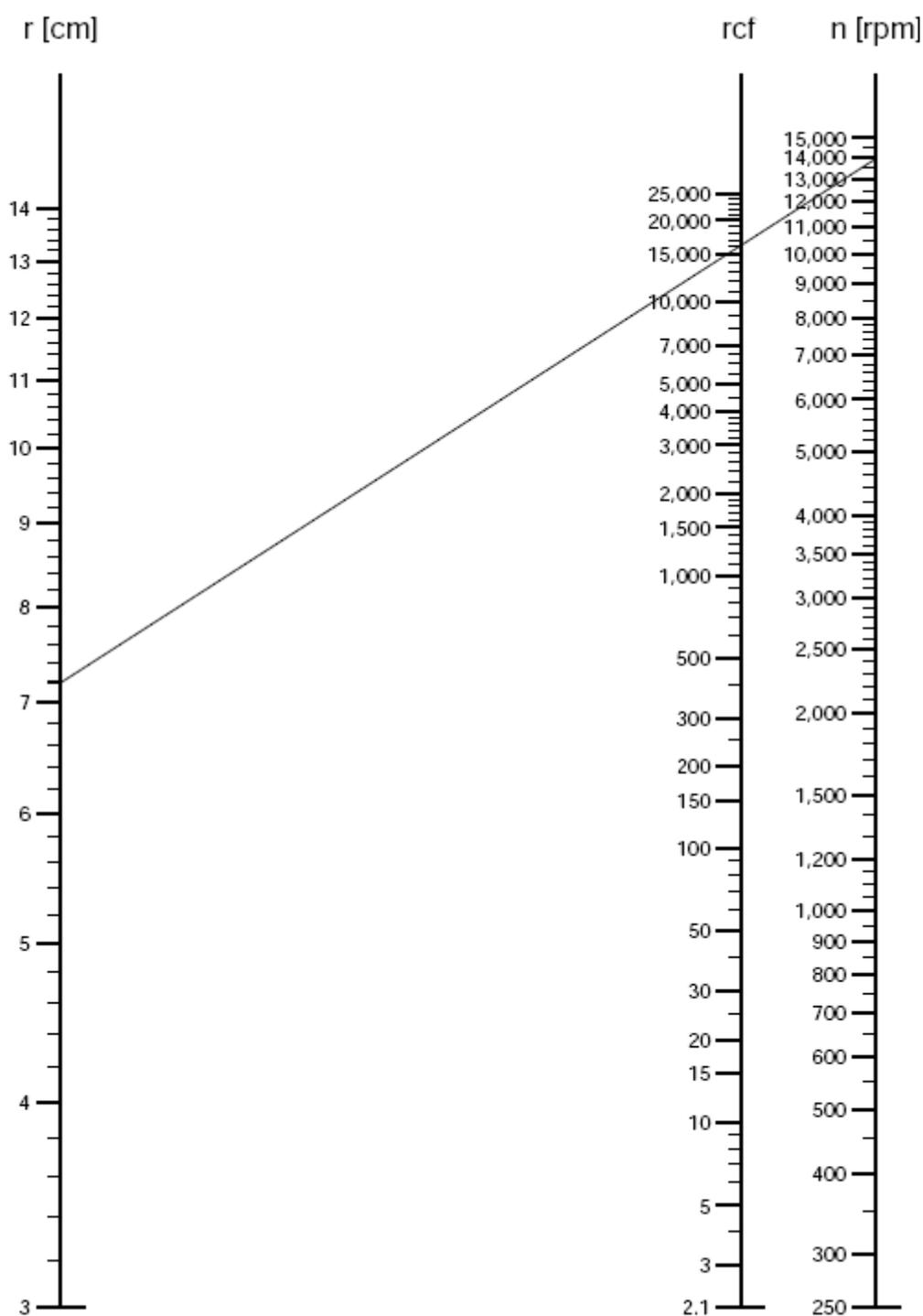
### 离心机转速换算公式 (rpm 与 g):

在有关离心机的实验中, RCF(relative centrifugal field) 表示相对离心力, 以重力加速度  $g$  ( $980.66\text{cm/s}^2$ ) 的倍数来表示; rpm(revolution perminute, 或 r/min) 表示离心机每分钟的转数。rpm 与  $g$  之间的换算公式为:  $\text{RCF} = 1.119 \times 10^{-5} \times (\text{rpm})^2 \times r$

其中  $r$  表示离心机转轴中心与离心管中心的距离 (如右图所示), 单位为  $\text{cm}$ 。由于离心管的位置由转子 (rotor) 决定, 因此  $r$  必须由查阅相关转子的参数而得。



附：快速换算表



180305