
产品信息和操作指南

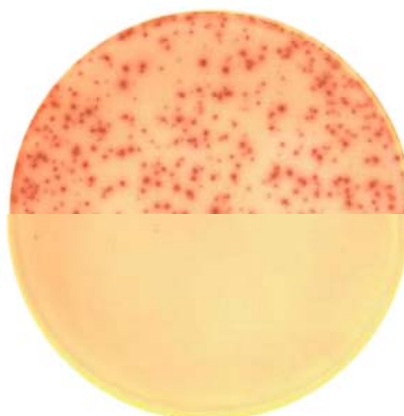
达优[®]冻存试剂盒

Cat# : UH-M1002-050

本试剂盒专用于科研，而非用于诊断

(1301)

达优[®]冻存试剂盒
UH-M1002-050



目录

目录	1
产品说明	2
试剂盒内容	3
需要实验者自行准备的试剂与仪器:	3
细胞冻存程序	4
细胞复苏程序	5
注意事项:	7
实验记录	10

产品说明

在ELISPOT检测的应用中，往往需要用到冻存的淋巴细胞样品作为检测细胞。由于ELISPOT检测的是细胞的免疫功能，不仅需要保证细胞的存活率，而且还要保证细胞的功能不发生变化。传统的细胞冻存方法通常是为了保存细胞种，对细胞存活率的要求不高，更没考虑保持细胞原有的免疫状态，所以传统的细胞冻存方法已经不能满足ELISPOT检测的要求。

考虑到ELISPOT检测的特殊性，达科为公司推出了达优[®]冻存试剂盒，在冻存液中添加了一系列对细胞有特殊保护作用的保护剂。达科为公司在自己的实验室以及国内数家客户的实验室做了细胞冻存与复苏的实验，并且对复苏之后的细胞做了ELISPOT检测。结果表明，淋巴细胞的存活率超过90%，ELISPOT斑点形成频率与新鲜细胞完全相同。

根据我们实验的经验，完美的细胞冻存效果需要优质的冻存试剂加上严格、规范的实验操作。二者缺一不可，不可偏颇。为了帮助国内的客户解决好细胞冻存的问题，达科为公司特此编撰这份详细的细胞冻存、复苏实验操作手册，仅供参考。

试剂盒内容

名称	规格	存放条件
达优 [®] 重悬液(Resuspension Medium)	25mL	-20 °C
达优 [®] 2×冻存液(2× Freezing Medium)	25mL	-20 °C

需要实验者自行准备的试剂与仪器:

- **热失活胎牛血清 (Heat Inactivation of Fetal Calf Serum HI-FCS)**：4℃解冻血清，完全解冻之后，放入56℃水浴30分钟，让补体蛋白失活。手册中所有的血清均是指热失活补体的血清。
- **R10培养基**：RPMI-1640培养基，含谷氨酰胺，加入10%血清，加入1%双抗。
- **R0培养基**：RPMI-1640培养基，含谷氨酰胺，加入1%双抗，不加血清。
- **ELISPOT无血清培养基**：含有谷氨酰胺和双抗，打开即用。
- 超净工作台；
- 可控温度离心机，配备50mL，15mL离心管的水平转头，建议使用专业的细胞离心机；离心管应采用无菌锥底聚丙烯管；
- P20, P200, P1000 微量移液器及吸嘴；
- 无菌0.5mL、1.5mL EP管，5mL、10mL吸管；
- 电动吸液器 (Pipette Aid) 及吸头；
- 细胞活性计数设备；
- 细胞冻存盒 “Mr. Frosty” 及无菌细胞冻存管，2mL，外螺旋；
- -80℃冰箱；
- 液氮罐；
- 37℃水浴锅；

细胞冻存程序

1. 将备用的细胞冻存管做上详细的记号。细胞冻存管放入-20℃热平衡，细胞冻存盒、达优®重悬液、达优®2×冻存液放入4℃热平衡。
2. 对要冻存的细胞进行计数，然后4℃，400g离心10分钟。
3. （冰上操作）弃上清，根据细胞计数的结果加入4℃的达优®重悬液重悬，使细胞浓度调整到两倍的冻存浓度（比如想要冻存的细胞浓度为： 1×10^7 cells/mL，就用重悬液将细胞浓度调整到 2×10^7 /mL），然后将细胞吹打均匀。注意：重悬液不含有DMSO，所以这一步动作可以稍微剧烈。
4. （冰上操作）逐滴加入等体积的冰浴过的达优®2×冻存液，（细胞浓度为 1×10^7 cells/mL）。注意：一定要逐滴加入，避免溶液中DMSO浓度的剧烈变化，详见后面的说明。
5. （冰上操作）以每管1mL细胞悬液的分量分装入在-20℃热平衡过的冻存管，然后将冻存管的盖子拧严实。否则液氮会渗漏进来。
6. 立即将冻存管放入已经在4℃热平衡过的冻存盒（“Mr. Frosty”），然后将冻存盒放入-80℃冰箱内。也可以将冻存管放于程序降温仪中，以1℃/分钟的速率降温到-80℃。
7. 24小时后，把-80℃保存的冻存管转移到液氮中。
8. 将细胞在液氮罐中冻存位置记录在实验室的液氮设备管理单上。

细胞复苏程序

1. R10培养基和R0培养基需要在4°C热平衡，无血清培养基需要37°C热平衡。50mL、15mL离心管需要4°C热平衡。水浴锅要预先调到37°C。
2. 用镊子将细胞冻存管从液氮中取出。如果有液氮渗漏到冻存管中，要稍微拧开管盖，让气化的液氮逃逸。

警告：据报道，有些冻存管在解冻时会发生爆炸，为了消除这种危险，建议实验中只使用牢固的聚乙烯冻存管用于液氮保存。

3. 用镊子夹住冻存管，浸入37°C水浴锅内。轻轻的晃动冻存管，注意管内冻存细胞的融化情况。当管内的冰核还有黄豆大小的时候，取出来，转移到超净工作台内。用酒精棉擦拭管口，然后将冻存管插于碎冰上。

注意：这一步对细胞存活率至关重要。既要尽快融化，以减少融化过程对细胞的损害；又要尽可能减少细胞在较高温度停留的时间，以减少DMSO对细胞的毒害。切不可将冻存管放在水浴锅内不管。

4. （冰上操作）打开冻存管管盖，逐滴加入1mL R10培养基(4°C)。轻柔的将冻存管内的细胞悬液（约2mL）吸取出来，转移到一个预冷的15mL离心管内。逐滴加入3mL R10培养基 (4°C)，边加边轻摇混匀，滴加完之后盖上管盖，轻轻地上下颠倒混匀。
5. 继续缓慢补加R10培养基 (4°C)至14mL，拧上盖子，轻轻地颠倒混匀。
6. 4°C，**250g**离心10 分钟。小心地吸出上清，要求上清液尽可能

吸走，同时又不触及管底沉淀的细胞。然后用手指轻弹离心管管底，将细胞团分散。

注意：吸出上清比倒出上清更彻底，有助于减少DMSO的残留；手指轻弹离心管可以很轻柔的将细胞团分散，不要用枪去吹吸，否则对细胞有伤害。

7. 加入14mL R0培养基 (4℃，拧上盖子，颠倒混匀。**说明：**改用R0培养基洗涤是为了将细胞过度到无血清培养基中，减少血清对ELISPOT检测的干扰。
8. 室温250g离心10分钟，弃上清。加入1mL无血清培养基，混合均匀。（从这一步开始，不再要求低温。）
9. （优化步骤，可以略过）如果细胞有成团现象，这是由于死细胞释放出来的DNA缠绕所致。可以加入0.1mL DNase(1mg/mL)，37℃孵育10分钟。
10. 取50μL细胞悬液，台盼蓝活细胞计数，计算存活率 (viability)。
说明：存活率=活细胞数/细胞总数×100%。在台盼蓝存在的情况下，活细胞呈无色，晶莹透亮，死细胞呈蓝色，暗淡无光。
11. （优化步骤，可以略过）让细胞休息过夜。具体做法是，松开离心管的盖子，倾斜置于含5% CO₂ 的细胞培养箱，37℃孵育过夜。次日，加入30mL不含血清的1640洗涤一次，再用无血清培养基重悬。再次做台盼蓝活细胞计数。
12. 根据计数结果，补加无血清培养基至所需要的细胞浓度，进行ELISPOT检测。

注意事项:

细胞冻存

影响细胞冻存质量的关键在于低温（4℃）操作和缓慢增加细胞溶液环境中的DMSO浓度。在滴加**达优® 2×冻存液**前后一定要在冰上操作，不让装有细胞的离心管、冻存管离开冰水。滴加**达优® 2×冻存液**时一定要缓慢，控制在每3秒1滴（1mL约22滴，大约一分钟滴加完毕）。液滴在从离心管管口滴落到管底时，会有一个自然的冲击力，另外滴入的**2×冻存液**密度较大，能够保证将滴入的液滴与管内的溶液混合起来，因此不需要额外的混合。如果不放心，可以轻轻摇动离心管，切不可用力过猛。DMSO浸入细胞后，细胞膜变得非常脆弱，容易破裂。

在细胞冷冻降温中，类似于“Mr. Frosty”的含异丙醇的细胞冻存盒能够提供接近于每分钟1℃的降温速度，从而保护细胞，减少来自细胞内冰核的伤害。每使用5次之后，细胞冻存盒内的异丙醇就应该更换，否则异丙醇的含水量会越来越高，细胞冻存盒的降温速度也会改变。降温速度对细胞的存活率有重要影响，应该严格控制不确定因素的干扰，建立标准化的实验操作。

细胞复苏

影响细胞复苏质量的关键在于低温（4℃）和缓慢降低细胞溶液环境中的DMSO浓度。在将解冻的细胞悬液从冻存管转移到离心管时，一定要在冰上操作。滴加最初1mL（在冻存管中）和3mL（在离心管中）R10培养基时一定要缓慢，控制在每秒1滴（1mL约22滴，在30秒左右滴加完毕）。由于R10培养基的密度比细胞冻存液的密度低，所以在滴加的时候要注意混合均匀。在将细胞悬液转移到15mL离心管之后，本操作手册规定了两次颠倒混合（一次是在离心管中滴加完3mL培养基后，二次是在补加满14mL培养

基之后)就是为了充分混合培养基与冻存液,这两步不能省略。此外,颠倒混匀的时候,不可用力猛摇,被DMSO浸润的细胞,细胞膜非常脆弱,容易破裂。

细胞存活率与恢复率

细胞冻存复苏的质量可以通过**存活率**(viability)来衡量。即在细胞复苏、洗涤之后,用台盼蓝进行细胞计数。**存活率 = 活细胞数 / 细胞总数 × 100%**。经台盼蓝染色,活细胞呈无色,晶莹剔透;死细胞呈蓝色,暗淡无光。

一般来说,如果细胞的存活率低于70%,ELISPOT检测结果会很糟糕。补救的办法是让细胞休息过夜,让进入凋亡程序的细胞有时间死亡,之后ELISPOT检测结果会有所改善。如果细胞的存活率高于80%就会获得较满意的ELISPOT检测结果。如果严格按本实验规范,可以保证存活率达到90%。在此存活率下,复苏的细胞可以直接做ELISPOT检测,不需要休息过夜。

与存活率相关联但又有显著区别的另一个概念是**恢复率**(recovery)。恢复率是指冻存、复苏之后回收到的活细胞和冻存前活细胞的比例。恢复率的高低取决于两个影响因素,即存活率和洗涤丢失比例。使用本试剂盒,细胞的存活率很高,它对恢复率的影响可以忽略。所以对恢复率的主要影响因素是洗涤过程中细胞的丢失。本操作手册中有两步洗涤,都在15mL离心管内进行,推荐的离心条件是250g和10分钟,按照这种操作,细胞的丢失应该在可接受的范围之内。如果觉得细胞丢失严重,可以将离心力加大到400g,时间延长到15-20分钟。同时我们推荐较高的细胞冻存浓度,即 $1 \times 10^7/\text{mL}$,甚至可以更高。如果细胞达不到这种浓度,也至少应该达到 $5 \times 10^6/\text{mL}$ 。

DMSO

达优[®]重悬液不含DMSO，达优[®]2X冻存液含有DMSO。由于DMSO对细胞有毒性，所以在涉及DMSO的操作步骤上，时间要尽可能短，以便减轻DMSO对细胞的损害。另外，低温条件时，细胞的生命活动弱，对DMSO的耐受程度高，所以要严格注意冰上操作。在随后的洗涤步骤上，要洗涤干净，尽可能减少残留的DMSO对细胞的伤害。暴露给DMSO时间的长短和剂量的高低将影响细胞的功能和存活率，从而在ELISPOT中引入不确定因素。所以要注意这些操作步骤的规范化和标准化，减少不确定因素的干扰。

实例：

冻存、复苏之后的人 PBMC，没有休息过夜，直接进行 ELISPOT 检测。均是直接孵育法，孵育 18 小时，无血清培养基，人 IFN- γ ELISPOT 试剂盒。

左图，负对照，20 万/孔；

右图，CEF 刺激，20 万/孔。

