



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114958742 B

(45) 授权公告日 2024. 01. 26

(21) 申请号 202210562961.6
 (22) 申请日 2022.05.23
 (65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 114958742 A
 (43) 申请公布日 2022.08.30
 (73) 专利权人 电子科技大学
 地址 610031 四川省成都市高新区(西区)
 西源大道2006号
 (72) 发明人 周红 孙浩 张安英 汪新艳
 杨鹏
 (74) 专利代理机构 北京集智东方知识产权代理
 有限公司 11578
 专利代理师 刘林
 (51) Int. Cl.
 C12N 5/0786 (2010.01)
 (56) 对比文件
 CN 102176919 A, 2011.09.07
 CN 108474787 A, 2018.08.31
 CN 111411080 A, 2020.07.14
 CN 207175927 U, 2018.04.03
 CN 107523542 A, 2017.12.29
 CN 111381050 A, 2020.07.07

JP 2019017291 A, 2019.02.07
 CN 104894056 A, 2015.09.09
 龙振洲.《免疫学译丛 4》.人民卫生出版社, 1988, 第276页.
 厉倩. 肺脏基质细胞诱导不成熟树突状细胞为调节性树突状细胞的研究.《CNKI》.2006, 第1-84页.
 李佩珊;张志欢;孙雄;吴显平;张永红;张涛. 不同酶消化液对大鼠肺微血管内皮细胞分离培养的影响.北京农学院学报.2020, (第02期), 全文.
 Zhaoyuan Liu等. Analysis of myeloid cells in mouse tissues with flow cytometry.《STAR Protocols》.2020, 全文.
 王宣刚等. 牙鲆头肾巨噬细胞的分离培养与鉴定.《渔业科学进展》.2021, 第55-61页.
 岳嘉宁;斯东锋;李济宇;杨勇;全志伟. 大鼠脾脏来源树突状细胞的分离培养及生物学特性. 上海交通大学学报(医学版). 2007, (03), 第311-314页.
 杨鹏. 草鱼单核/巨噬细胞的分离鉴定和激活新机制的研究.《万方》.2014, 第1-103页. (续)

审查员 李非儿

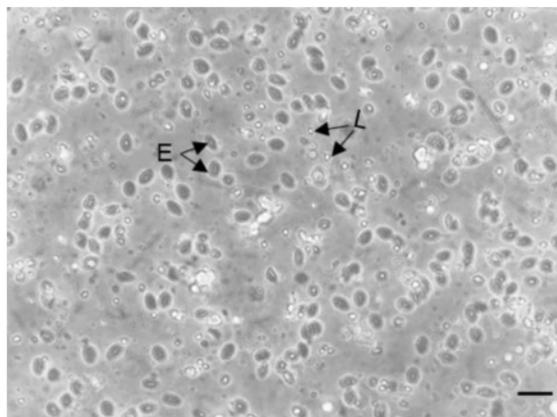
权利要求书2页 说明书5页 附图3页

(54) 发明名称

一种分离草鱼脾脏巨噬细胞的方法

(57) 摘要

本发明提供了一种分离草鱼脾脏巨噬细胞的方法,所述方法包括:取出草鱼的脾脏组织,并对所述脾脏组织进行清洗;将清洗之后的脾脏组织浸泡于样本稀释液中并对其进行研磨得到组织匀浆悬液;将所述组织匀浆悬液添加到消化液中,添加后进行震荡消化,得到消化产物;对所述消化产物进行过滤和离心处理,得到第一产物,对所述第一产物进行计数点板操作后进行培养得到所述草鱼的脾脏巨噬细胞。通过本发明的方法分离得到的鱼类脾脏巨噬细胞具有数目多、细胞状态良好和成功率高的优点。



CN 114958742 B

[接上页]

(56) 对比文件

Satoshi Fujiyama等. Identification and isolation of splenic tissue-resident macrophage sub-populations by flow cytometry.《International Immunology》

.2019,摘要,第52页右栏第2段,第55页右栏第2段-第56页左栏第1段,图1B.

闫峰等.人脾脏巨噬细胞的分离与纯化.《西安交通大学学报(医学版)》.2004,第513-516页.

1. 一种分离草鱼脾脏巨噬细胞的方法,其特征在于,包括:
取出草鱼的脾脏组织,并对所述脾脏组织进行清洗;
将清洗之后的脾脏组织浸泡于样本稀释液中并对其进行研磨得到组织匀浆;
将所述组织匀浆添加到消化液中,添加后进行震荡消化,得到消化产物,所述添加后进行震荡消化包括添加后在水浴温度为30℃的水浴摇床中进行消化;
对所述消化产物进行过滤和离心处理,得到过滤和离心处理后的产物,对所述过滤和离心处理后的产物进行计数点板操作后进行培养得到所述草鱼的脾脏巨噬细胞;
其中,将所述组织匀浆添加到消化液中包括:
将所述组织匀浆添加到BD管中,再往所述BD管中加入样本稀释液或培养基至总体积为9.7mL,加入样本稀释液或培养基后再往所述BD管加入胶原酶、分散酶和三抗,所述胶原酶、分散酶和三抗的添加量相等,所述胶原酶为胶原酶-II,所述分散酶为分散酶-II。
2. 根据权利要求1所述的分离草鱼脾脏巨噬细胞的方法,其特征在于,所述胶原酶、分散酶和三抗的添加量均为100uL。
3. 根据权利要求1所述的分离草鱼脾脏巨噬细胞的方法,其特征在于,所述添加后在水浴温度为30℃的水浴摇床中进行消化,包括:
添加后在水浴温度为30℃的水浴摇床中消化40-50min,摇床的转速为100rpm。
4. 根据权利要求1所述的分离草鱼脾脏巨噬细胞的方法,其特征在于,对所述消化产物进行过滤和离心处理,得到过滤和离心处理后的产物,包括:
将所述消化产物过200目细胞筛网,得到过滤后的草鱼脾脏细胞悬液,将所述过滤后的草鱼脾脏细胞悬液重悬后转移至BD管中并用样本稀释液补齐至20mL,并混合均匀,得到细胞悬液;
将所述细胞悬液平均添加到两个BD管中,每一个所述BD管中均预盛有10mL淋巴细胞分离液,添加后进行配平操作,配平后进行第一次离心,离心后将在所述淋巴分离液和所述稀释液的临界层中的物质取出,得到淋巴细胞分离液上层的近白色絮状细胞层;
将所述淋巴细胞分离液上层的近白色絮状细胞层全部添加至预盛有样本稀释液的BD管中,添加后进行配平操作,配平后进行第二次离心,离心后清除所述BD管中的上清液,清除后进行重悬,得到过滤和离心处理后的产物。
5. 根据权利要求4所述的分离草鱼脾脏巨噬细胞的方法,其特征在于,在所述第一次离心的过程中,利用吊篮离心机在温度为22℃,转速为2950rpm的条件下离心15分钟;在所述第二次离心的过程中,利用吊篮离心机在温度为22℃,转速为2390rpm的条件下离心2分钟。
6. 根据权利要求1所述的分离草鱼脾脏巨噬细胞的方法,其特征在于,对所述过滤和离心处理后的产物进行计数点板操作后进行培养得到所述草鱼的脾脏巨噬细胞,包括:
对所述过滤和离心处理后的产物进行计数和点板操作,点板后放入细胞培养箱进行培养,得到巨噬细胞,培养后进行细胞清洗处理,得到贴壁巨噬细胞;
观察所述贴壁巨噬细胞是否符合继续培养的要求,若符合则再使用培养基继续培养,得到所述草鱼的脾脏巨噬细胞。
7. 根据权利要求6所述的分离草鱼脾脏巨噬细胞的方法,其特征在于,所述培养基为含10%FBS和1%三抗的RPMI1640培养基。

8. 根据权利要求6所述的分离草鱼脾脏巨噬细胞的方法, 其特征在于, 若符合则再使用培养基继续培养至少2h, 得到所述草鱼的脾脏巨噬细胞。

一种分离草鱼脾脏巨噬细胞的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及细胞分离技术领域,具体而言,涉及一种分离草鱼脾脏巨噬细胞的方法。

背景技术

[0002] 原代细胞培养是目前研究鱼类免疫细胞特定生理功能重要的手段。但是由于低等脊椎动物细胞培养操作繁琐,细胞得率低,成本较高,关于鱼类脾脏巨噬细胞的分离,目前未见公开发表的专利。若仅参考哺乳动物脾脏原代巨噬细胞培养进行鱼类细胞培养,由于鱼类脾脏较哺乳动物的脾脏小,因此脾脏巨噬细胞得率太低(分离的白细胞总数一般为 $1 \sim 5 \times 10^6$,而一般western blotting实验需要约 1×10^7 leukocytes/well进行壁后获得足够的巨噬细胞),因此哺乳动物传统的物理研磨结合淋巴分离液的分离方法并不能完全适用鱼类。因此开发一种高效稳定的鱼类脾脏原代巨噬细胞分离方法迫在眉睫。

发明内容

[0003] 本发明的目的在于提供一种分离草鱼脾脏巨噬细胞的方法,以改善上述问题。

[0004] 为了实现上述目的,本申请实施例提供了如下技术方案:

[0005] 一种分离草鱼脾脏巨噬细胞的方法,包括:

[0006] 取出草鱼的脾脏组织,并对所述脾脏组织进行清洗;

[0007] 将清洗之后的脾脏组织浸泡于样本稀释液中并对其研磨得到组织匀浆;

[0008] 将所述组织匀浆添加到消化液中,添加后进行震荡消化,得到消化产物;

[0009] 对所述消化产物进行过滤和离心处理,得到第一产物,对所述第一产物进行计数点板操作后进行培养得到所述草鱼的脾脏巨噬细胞。

[0010] 可选的,将所述组织匀浆添加到消化液中包括:

[0011] 将所述组织匀浆添加到第一容器中,再往所述第一容器中加入样本稀释液或培养基至总体积为第一数值,加入样本稀释液或培养基后再往所述第一容器加入胶原酶、分散酶和三抗,所述胶原酶、分散酶和三抗的添加量相等。

[0012] 可选的,所述第一数值为9.7mL,所述胶原酶、分散酶和三抗的添加量均为100uL。

[0013] 可选的,所述添加后进行震荡消化,包括:

[0014] 添加后在水浴温度为30℃的水浴摇床中进行消化。

[0015] 可选的,所述添加后在水浴温度为30℃的水浴摇床中进行消化,包括:

[0016] 添加后在水浴温度为30℃的水浴摇床中消化40-50min,摇床的转速为100rpm/min。

[0017] 可选的,对所述消化产物进行过滤和离心处理,得到第一产物,包括:

[0018] 将所述消化产物过第一筛网,得到第一过滤物,将所述第一过滤物重悬后转移至第二容器中并用样本稀释液补齐至20mL,并混合均匀,得到第一混合物;

[0019] 将所述第一混合物平均添加到两个第三容器中,每一个所述第三容器中均预盛有

10mL淋巴细胞分离液,添加后进行配平操作,配平后进行第一次离心,离心后将在所述淋巴分离液和所述稀释液的临界层中的物质取出,得到第二混合物;

[0020] 将所述第二混合物全部添加至预盛有样本稀释液的第四容器中,添加后进行配平操作,配平后进行第二次离心,离心后清除所述第四容器中的上清液,清除后进行重悬,得到第一产物。

[0021] 可选的,在所述第一次离心的过程中,利用吊篮离心机在温度为22℃,转速为2950rpm的条件下离心15分钟;在所述第二次离心的过程中,利用吊篮离心机在温度为22℃,转速为2390rpm的条件下离心2分钟。

[0022] 可选的,对所述第一产物进行计数点板操作后进行培养得到所述草鱼的脾脏巨噬细胞,包括:

[0023] 对所述第一产物进行计数和点板操作,点板后放入细胞培养箱进行培养,得到巨噬细胞,培养后进行细胞清洗处理,得到贴壁巨噬细胞;

[0024] 观察所述贴壁巨噬细胞是否符合继续培养的要求,若符合则再使用培养基继续培养,得到所述草鱼的脾脏巨噬细胞。

[0025] 可选的,所述培养基为含10%FBS和1%三抗的RPMI1640培养基。

[0026] 可选的,若符合则再使用培养基继续培养至少2h,得到所述草鱼的脾脏巨噬细胞。

[0027] 本发明的有益效果为:

[0028] 1、鱼类脾脏外被薄层结缔组织,而胶原酶能在生理PH和温度条件下特异性地水解结缔组织中的胶原蛋白的三维螺旋结构且不损伤其它蛋白质和组织,因此本发明使用胶原酶-II消化脾脏中胶原蛋白,进而易于实体组织中各种细胞的分离;分散酶-II可用于从多种不同的组织和器官中制备细胞。分散酶-II已被证明是一种快速有效且温和的试剂,可用于分离许多体外生长的组织和细胞,由于它不会破坏细胞膜,因此分散酶特别适用于组织分解和继代培养。因此,本方法相对传统机械法,可以明显的提高脾脏巨噬细胞白细胞的得率。

[0029] 2、通过本发明的方法分离得到的鱼类脾脏巨噬细胞具有数目多、细胞状态良好和成功率高的优点。

[0030] 本发明的其他特征和优点将在随后的说明书阐述,并且,部分地从说明书中变得显而易见,或者通过实施本发明实施例了解。本发明的目的和其他优点可通过在所写的说明书、权利要求书、以及附图中所特别指出的结构来实现和获得。

附图说明

[0031] 附图用来提供对本发明技术方案的进一步理解,并且构成说明书的一部分,与本申请的实施例一起用于解释本发明的技术方案,并不构成对本发明技术方案的限制。

[0032] 图1为采用机械法分离得到的草鱼脾脏细胞悬液照片;

[0033] 图2为采用本实施例1中的分离方法得到的草鱼脾脏细胞悬液照片;

[0034] 图3为点板结束后还未开始培养时的细胞照片;

[0035] 图4为培养3h后贴壁巨噬细胞的照片;

[0036] 图5为贴壁巨噬细胞继续培养48h后得到的草鱼的脾脏巨噬细胞的照片;

[0037] 图6为贴壁巨噬细胞继续培养48h后得到的草鱼的脾脏巨噬细胞的形态鉴定照片。

具体实施方式

[0038] 基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有作出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0039] 本发明实施例中使用的实验方法若无特殊说明,均为常规方法。

[0040] 本发明提供了一种分离草鱼脾脏巨噬细胞的方法,所述方法,包括:

[0041] (一) 实施动物:700g左右健康草鱼

[0042] (二) 实验试剂:大鼠淋巴分离液(天津灏洋),RPMI1640培养基(Gibco),灭活胎牛血清FBS(Gibco),胶原蛋白酶II(sigma),PluriSTEM®分散酶II(sigma),三抗(青霉素、链霉素及双氢霉素,Aladdin),PBS(Gibco);

[0043] (三) 实施步骤:

[0044] 3.1准备工作:

[0045] (1) 2把手术剪(直径8cm、16cm大小各一个)、1个镊子、细胞筛网1个、细胞分离杵1个提前灭菌(121℃,30min);

[0046] (2) 准备大鼠淋巴分离液,灭活PBS,RPMI1640培养基,BD管,细胞筛网(200目),60培养皿,细胞培养板,巴氏吸管等试验试剂和耗材;

[0047] 3.2取脾脏:草鱼麻醉后,快速断脊柱,解剖出草鱼整体内脏,顺着脾脏与肝胰脏相连的结缔组织,小心取出完整脾脏(注意:正常的脾脏为鲜红色(病鱼的脾脏呈红黑色),器官边缘棱角清楚,质地紧实且富有弹性,非臃肿糜烂态(病鱼)),放入加有样本稀释液或RPMI1640培养基的培养皿中,倾斜并轻晃dish,使脾脏组织完全浸没。

[0048] 3.3弃培养基,加3mL RPMI1640培养基洗脾脏,弃培养基,加入1-2mL样本稀释液,用手术小剪刀剪碎脾脏组织;用细胞分离杵挤压脾脏组织,达到组织匀浆(均匀的浆糊状态,不应有颗粒感),便于后续消化,尽量垂直挤压组织,勿推动杵棒,以免对细胞造成机械损伤,产生细胞碎片,降低细胞得率;挤压脾脏组织需要反复多次。

[0049] 3.4消化脾脏组织

[0050] 将脾脏组织匀浆转移至第一容器即50ml BD管中,加适量样本稀释液(或RPMI1640培养基)至总体积为9.7mL,再加100uL胶原酶II、100uL分散酶II和100uL三抗,添加后在30℃水浴摇床(100rpm/min)中消化40-50min,此步骤相对传统的机械法明显提高脾脏巨噬细胞白细胞得率。鱼类脾脏外被薄层结缔组织,而胶原酶能在生理PH和温度条件下特异性地水解结缔组织中的胶原蛋白的三维螺旋结构且不损伤其它蛋白质和组织,因此使用胶原酶-II消化脾脏中胶原蛋白,易于实体组织中各种细胞的分离;分散酶-II已被证明是一种快速有效且温和的试剂,可用于分离许多体外生长的组织和细胞;由于不会破坏细胞膜,分散酶特别适用于组织分解和继代培养。

[0051] 3.5将经上步骤消化后得到的消化产物,即草鱼脾脏细胞悬液过200目筛网,将过滤后的草鱼脾脏细胞悬液即第一过滤物转移至第二容器即一支新的BD管中并用样本稀释液补齐至20mL,并充分混匀,形成细胞悬液,即第一混合物;用1mL移液枪分别沿管壁缓慢加入10mL的细胞悬液至各预盛有10mL淋巴细胞分离液的两只BD管,即第三容器中,此步骤注意:细胞悬液要沿管壁缓慢加到淋巴细胞分离液表面,此时细胞悬液会在淋巴细胞分离液上层,后面加的时候也不能破坏细胞悬液与淋巴细胞分离液中间的界面。

[0052] 3.6将两支加好淋巴细胞分离液和细胞悬液的BD管取出,配平后,吊篮离心机22

℃,2950rpm离心15分钟(accel:6,brake:4)。

[0053] 3.7取BD管,此时脾脏混合白细胞为淋巴细胞分离液上层的近白色絮状细胞层(在淋巴分离液和稀释液的临界层),用巴氏吸管轻轻吸取出该层细胞即第二混合物于已经加过样本稀释液的第四容器BD管中,在22℃,2390rpm离心2分钟。

[0054] 3.8弃上清,加入5mL RPMI1640培养基(含1%三抗和1%FBS)重悬细胞,得到第一产物,取5uL的第一产物用于细胞计数。

[0055] 3.9点板:以6well板为例,每孔的细胞一般需要 2×10^7 脾脏白细胞(其他孔板培养所需细胞密度可以以此计算),28℃细胞培养箱(5%CO₂)培养2-3h。

[0056] 3.10显微镜下观察贴壁情况,待贴壁后,开始洗去未贴壁细胞,用PBS洗2-3遍,显微镜下观察贴壁巨噬细胞的占比和细胞的形态,如果贴壁巨噬细胞占每个well的面积占比50-70%且细胞的形态正常(正常草鱼脾脏巨噬细胞近不规则圆形或椭圆形,细胞边缘常有突起;细胞无空泡或较少空泡时为正常状态,若空泡严重时则细胞不正常),再使用含10%FBS、1%三抗的RPMI 1640培养基继续培养,培养至少2h,最后得到草鱼的脾脏巨噬细胞。

[0057] 本发明先后进行过多次试验,现举一部分试验结果作为参考对发明进行进一步详细描述,下面结合具体实施例进行详细说明。

[0058] 实施例1

[0059] 本实施例提供了一种分离草鱼脾脏巨噬细胞的方法,所述方法,包括:

[0060] (一)实施动物:703g健康草鱼

[0061] (二)实验试剂:大鼠淋巴分离液(天津灏洋),RPMI1640培养基(Gibco),灭活胎牛血清FBS(Gibco),胶原蛋白酶II(sigma),PluriSTEM®分散酶II(sigma),三抗(青霉素、链霉素及双氢霉素,Aladdin),PBS(Gibco);

[0062] (三)实施步骤:

[0063] 3.1准备工作:

[0064] (1)2把手术剪(直径8cm、16cm大小各一个)、1个镊子、细胞筛网1个、细胞分离杵1个提前灭菌(121℃,30min);

[0065] (2)准备大鼠淋巴分离液,灭活PBS,RPMI1640培养基,BD管,细胞筛网(200目),60培养皿,细胞培养板,巴氏吸管等试验试剂和耗材;

[0066] 3.2取脾脏:草鱼麻醉后,快速断脊柱,解剖出草鱼整体内脏,顺着脾脏与肝胰脏相连的结缔组织,小心取出完整脾脏,放入加有样本稀释液或RPMI1640培养基的培养皿中,倾斜并轻晃dish,使脾脏组织完全浸没。

[0067] 3.3弃培养基,加3mL RPMI1640培养基洗脾脏,弃培养基,加入1-2mL样本稀释液,用手术小剪刀剪碎脾脏组织;用细胞分离杵挤压脾脏组织,达到组织匀浆(均匀的浆糊状态,不应有颗粒感),便于后续消化,尽量垂直挤压组织,勿推动杵棒,以免对细胞造成机械损伤,产生细胞碎片,降低细胞得率;挤压脾脏组织需要反复多次。

[0068] 3.4消化脾脏组织

[0069] 将脾脏组织匀浆转移至第一容器即50ml BD管中,加适量样本稀释液(或RPMI1640培养基)至总体积为9.7mL,再加100uL胶原酶II、100uL分散酶II和100uL三抗,添加后在30℃水浴摇床(100rpm/min)中消化50min,经过本步骤消化后得到草鱼脾脏细胞悬液,如图2所示,图1为采用机械分离法分离得到的草鱼脾脏细胞悬液。通过观察图1和图2(图1和图2

中的图示简写说明为:E:红细胞(erythrocyte);L:白细胞(leukocyte),可以明显的得出本步骤相对传统的机械法明显提高了脾脏巨噬细胞白细胞得率。

[0070] 3.5将经上步骤消化后得到的消化产物,即草鱼脾脏细胞悬液过200目细胞筛网,将过滤后的草鱼脾脏细胞悬液即第一过滤物转移至第二容器即一支新的BD管中并用样本稀释液补齐至20mL,并充分混匀,形成细胞悬液,即第一混合物,用1mL移液枪分别沿管壁缓慢加10mL的细胞悬液至各预盛有10mL淋巴细胞分离液的两只BD管,即第三容器中,此步骤注意:细胞悬液要沿管壁缓慢加到淋巴细胞分离液表面,此时细胞悬液会在淋巴细胞分离液上层,后面加的时候也不能破坏细胞悬液与淋巴细胞分离液中间的界面。

[0071] 3.6将两支加好淋巴细胞分离液和细胞悬液的BD管在22℃,2950rpm离心15分钟(accel:6,brake:4)。

[0072] 3.7取出BD管,此时脾脏混合白细胞为淋巴细胞分离液上层的近白色絮状细胞层(在淋巴分离液和稀释液的临界层),用巴氏吸管轻轻吸取出该层细胞即第二混合物于已经加过样本稀释液的第四容器BD管中,在22℃,2390rpm离心2分钟。

[0073] 3.8弃上清,5mL RPMI1640培养基(含1%三抗和1%FBS)重悬细胞,得到第一产物,取5uL的第一产物用于细胞计数。

[0074] 3.9点板:取6well板,每孔植入 1.24×10^8 个脾脏白细胞,点板结束后还未开始培养时的细胞照片如图3所示。28℃细胞培养箱培养3h。

[0075] 3.10细胞培养箱培养3h后,显微镜下观察贴壁情况,待贴壁后,开始洗去未贴壁细胞,用PBS洗2遍,显微镜下观察贴壁巨噬细胞的占比和细胞的形态,本实施例的贴壁巨噬细胞如图4所示,本实施例中的贴壁巨噬细胞占每个well的面积占比在50-70%的区间内且细胞的形态正常;

[0076] 3.11将上述得到的贴壁巨噬细胞使用含10%FBS、1%三抗(青霉素、链霉素和双氢霉素)的RPMI1640培养基继续培养48h,最后得到草鱼的脾脏巨噬细胞。培养48h后细胞如图5所示,利用Giemsa staining进行形态鉴定,鉴定结果为图6。可以看出细胞形态和大小符合鱼类巨噬细胞特征:细胞核为紫红色,胞质为浅蓝色,偶见少许空泡;胞核偏位、肾形,核径约占细胞的1/3-1/2。

[0077] 以上所述仅为本发明的优选实施例而已,并不用于限制本发明,对于本领域的技术人员来说,本发明可以有各种更改和变化。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

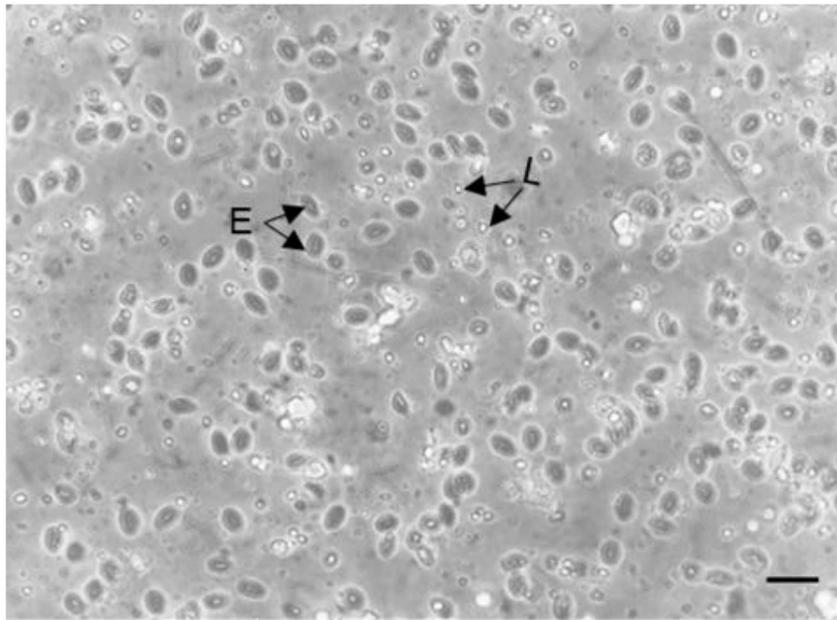


图1

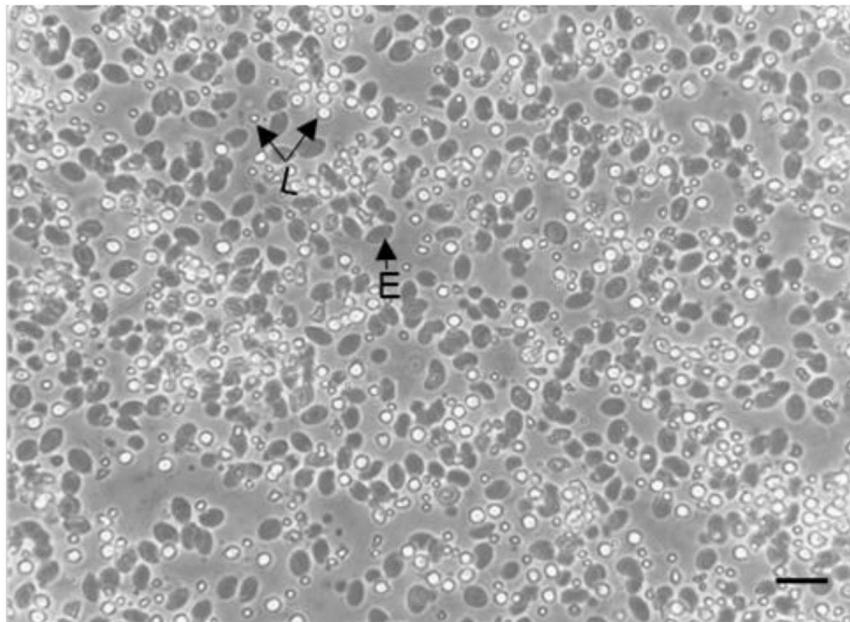


图2

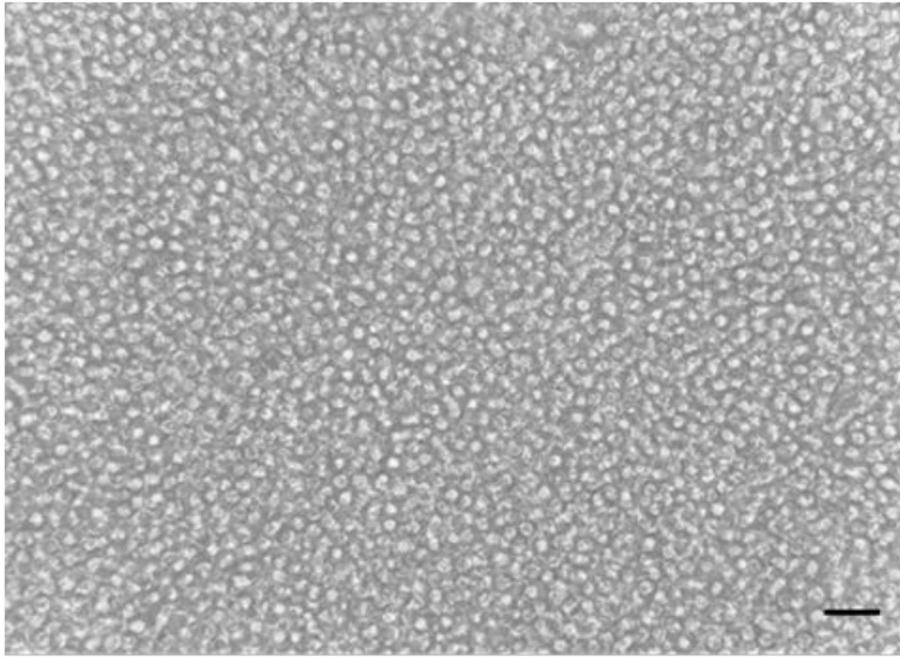


图3

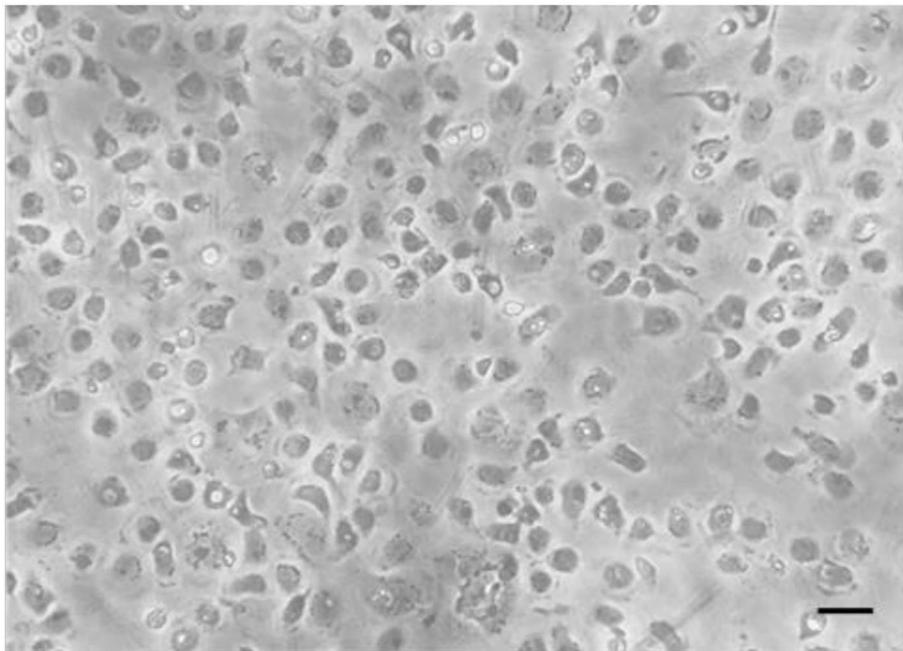


图4

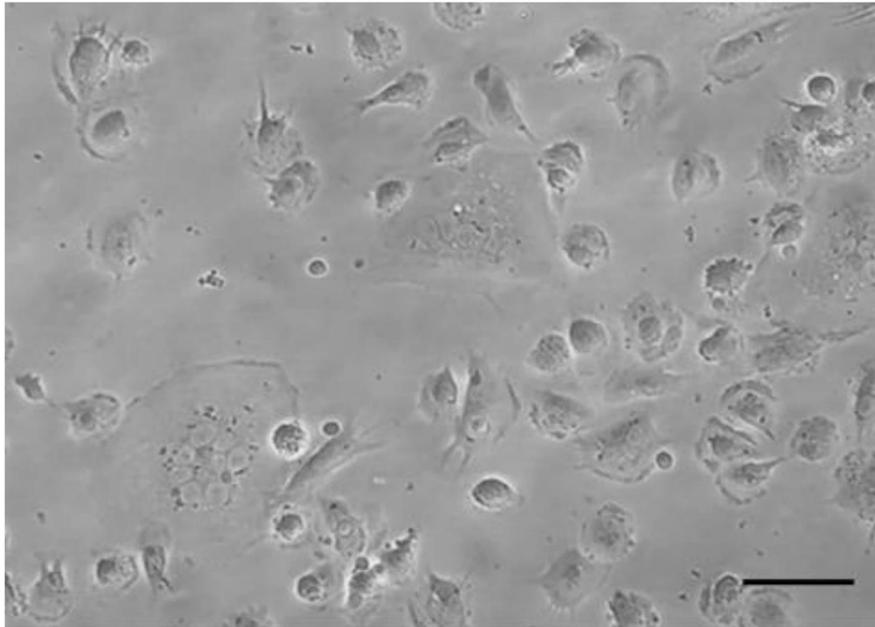


图5

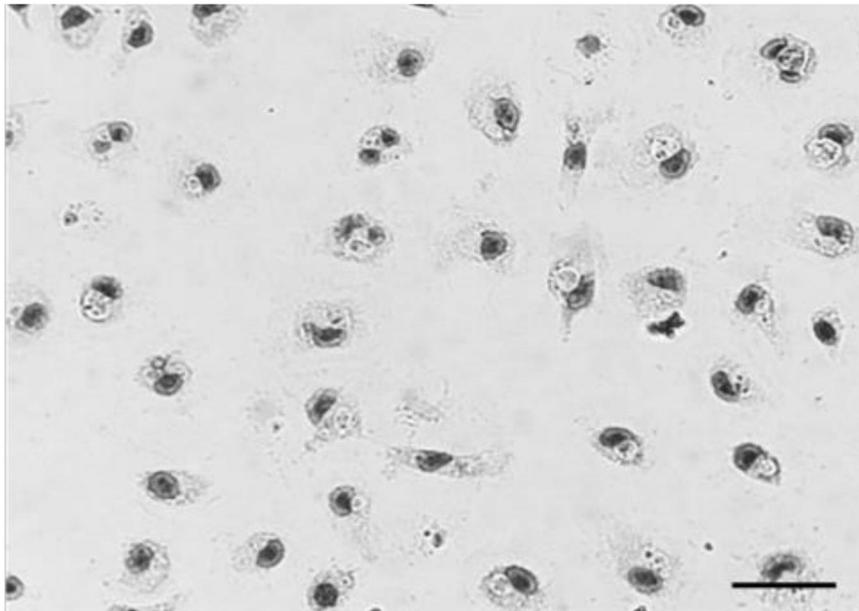


图6