

# 细胞电融合仪

## ECM<sup>®</sup>2001

安装/操作手册

*EASTWIN*

**BTX<sup>®</sup>**  
A Division of Genetronics, Inc.

# 目 录

1. 检查清点货物及安装
2. 技术规格
3. 操作细则
4. 产生杂交瘤的实验方法
5. 服务及保修

## 第一节 检查清点货物及安装

### 1. 拆封包装:

ECM 2001 细胞电融合仪采用纸箱包装, 收到货物后, 请检查包装完好程度, 如果有任何损伤请速与我公司联系。

请小心地拆开包装, 将仪器及附件取出, 并依据合同清点货物内容及数量, 如果有任何外观损伤或者货物与合同有差异, 请速与我公司联系。

请保留包装箱, 以便满足将来一旦要运送该仪器的需求。

### 2. 电源:

该仪器采用 220V 电源, 请确认您的电源为稳定的 220V。如果电源不稳定的话, 有可能对仪器造成严重损害! 请确认您的电源严格接地, 我们提供给您的电源线为三芯带地线电源。请不要改动该三芯电源线结构, 否则有可能对仪器造成严重伤害!

### 3. 安装:

如果确认仪器包装无问题, 且与合同相符, 则可以进行安装。

请将仪器安装在一个干燥, 水平, 常温环境中。尽量避免灰尘和化学药品对仪器的损害。

仪器与其他物品的距离不少于 15 厘米, 以保证仪器冷却的需求。

将电源线等附件拆包装, 待用, 依据后续章节继续操作。

## 第二节 技术规格

### 1. 外观尺寸:

宽: 17 "

高: 11 "

长: 17.5 "

### 2. 重量:

47 磅

### 3. 电气规格:

电源: 220V, 单相, 7A 耐熔保险

交流: 频率固定在 1MHZ

电压: 0 - 75 V (从零到峰值)

脉冲时间: 0 - 99 秒

直流: 高电压模式 (HV)

电压: 10 - 3000 V (峰值)

脉冲时间: 1 - 99 毫秒

低电压模式 (LV)

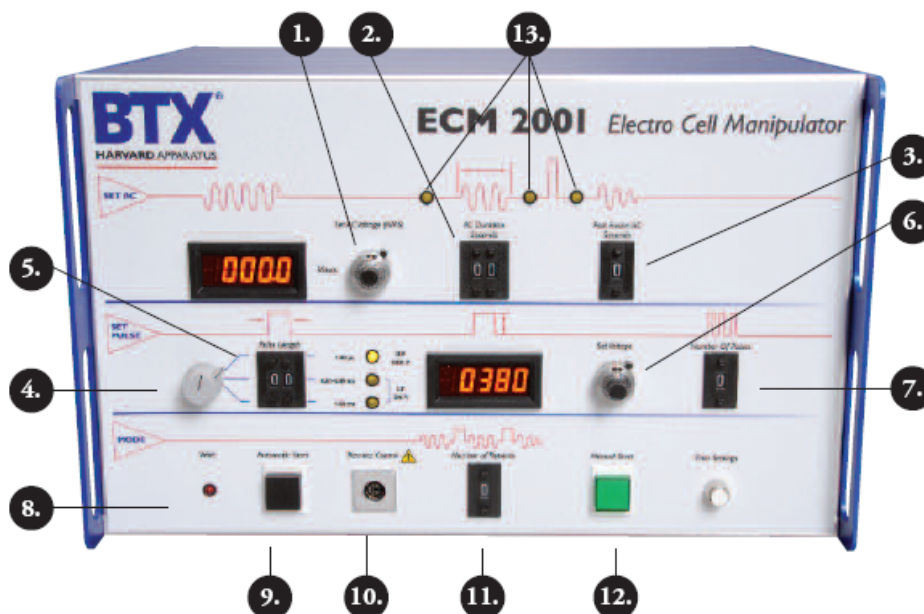
电压: 10 - 500 V (峰值)

脉冲时间: 1 - 99 毫秒

0.01 – 0.99 毫秒

脉冲次数：1 – 99

#### 4. 前面板控制介绍：



编号	名称	功能
1	SET AC VOLTAGE	此旋钮用于设置交流电压 (0-75V)。调整的数值显示在左侧的显示屏上。
2	AC DURATION SECONDS	此按钮用于设置自动模式下交流电被激活时间的长度。时间用“+”和“-”按钮设置，最大到 99 秒。
3	POST FUSION AC SECONDS	此按钮用于设置自动模式下脉冲施加后作用的时间。最大到 9 秒，使融合后的细胞聚集在一起。
4	SELECT THE MODE	此旋钮用于选择电穿孔模式： HV 高压模式 (10-3000 伏/1-99 微秒)； LV 低压模式 (10-500 伏 /0.01-0.99 毫秒)； LV 低压模式 (50-500 伏/1-99 毫秒)。 一旦模式选择好，相应的指示灯就会亮起。
5	PULSE LENGTH	此按钮用于控制电穿孔/电融合方形脉冲的脉冲长度，设定选择用 Lower(+)和 Upper(-)按键。
6	SET VOLTAGE	此旋钮用于调节脉冲电压。 HV 高压模式下，电压显示单位为千伏，设定范围为 10-3000 伏；LV 低压模式下，设定范围为 10-500 伏。 顺时针旋转电压增加，逆时针旋转电压减小
7	NUMBER OF PULSES	此按钮用于设定脉冲个数 (1-99)。“+”和“-”按钮用来选择所需脉冲个数。每向融合池发送一个脉冲，黄灯就会亮一下，同时发出一声嘟嘟声
8	WAIT	当仪器运行到一个循环结束时，出于安全原因放掉电容器中的所有电荷，此灯会亮。 <b>当此灯亮起的时候，绝对不能操作主机。</b>
9	AUTOMATIC START	按一下并释放此按钮，可根据预先设定的电压、脉冲长度、脉冲个数激发一个排列和电穿孔循环。

10	REMOTE	此接口用于连接远程控制盒，可以远距离操作主机。
11	NUMBER OF REPEATS	此按钮用于设定重复循环次数，最多可达 9 次。
12	MANUAL START	此双位置按钮允许手动控制 ECM 2001，第一次按下按钮，仪器开始工作，灯亮表示电压持续施加。第二次按出按钮，灯熄灭时，电融合电压被送到融合池上。

### 第三节 操作细则

#### 1. 注意事项:

请严格按照下述操作细则对 ECM 2001 进行操作。

**在没有连接打印机的情况下，严禁按“PRINT SETTINGS”按钮！否则仪器将会锁死。**

**如果打开仪器电源的时候，发现“MANUAL START”按钮处于亮灯状态，请马上关闭电源！**

#### 2. 程序或步骤（操作过程）

**高电压警告：**为了实际操作和安全的原因，在手动或自动操作模式中，ECM 2001 在施加交流电场或直流脉冲的过程中，请不要接触任何电缆或电极连接处，当需要连接或拆下电缆时，要检查系统不在操作中或处于备用状态。

##### Automatic 自动操作模式:

1. 连接 Chamber（融合池）和位于 ECM 2001 背面的输出插口。
2. 把 ECM 2001 的电源线插到合适的电源插座上（220 伏）。
3. 打开 ECM 2001 背面上的电源开关。
4. 设定所需的 AC Voltage (1) 即交流电压。
5. 设定所需的 AC Duration Seconds (2) 即交流持续时间。
6. 选择 HV 或 LV 模式(4)。
7. 设定 DC Pulse Length (5) 即直流脉冲长度。
8. 设定 DC Voltage(6) 即直流电压。
9. 设定 Number of Pulses (7) 即脉冲个数。
10. 设定 Post-Fusion AC Seconds (3) 即融合后交流时间到所需的脉冲长度。
11. 把细胞悬液/试剂倒入 BTX Chamber（融合池）中。
12. 检查所有的设置。
13. 按下 Automatic Start(9) 即自动按钮，ECM 2001 发出一声嘟嘟声，把预先设置的所有参数送到 Chamber（融合池）上。
14. 仅对电穿孔来讲，设置 AC Voltage (1)、AC Duration (2)和 Post-Fusion AC (3) 为零，其余步骤不变。

##### Manual 手动操作模式:

1. 其余步骤同 1-11，按一下 Manual Start(12) 即手动按钮，手动模式中，AC Duration (2) 即交流持续时间按钮不再起作用，持续施加交流电场。在显微镜下观察 Chamber 中细胞，当细胞相互接近成二聚体时，再次按一下 Manual Start(12) 即手动按钮，结束交流场。ECM 2001 发送电穿孔脉冲。  
注意：交流电压的值不能在指示器上调节。

#### 3. 操作参数的选择:

1. 排列参数:
  - AC Voltage: 设置交流电压。
  - AC Pulse Length: 设置脉冲长度。
2. 电穿孔参数:
  - 选择高压模式 (HV) 或低压模式 (LV) (4)

Pulse Length : 设置直流脉冲长度。

DC Voltage: 设置直流电压。

Number of Pulses: 设置脉冲次数。

3. 融合后交流参数: AC 默认设置, 可设置脉冲长度

#### 4. 显微镜和载玻片的使用

在显微镜下操作载玻片时, 使用手动模式更有利。这样, 只要排列已经成功立即停止 使用秒表测量所需的排列时间。当使用更大一些的融合池时, 在自动模式中设定相同的或更长一点的时间。如果演示给许多人, 使用带有电视摄像机和显示器的显微镜。

## 第四节 产生杂交瘤的实验方法

### 本章节中的相关具体步骤请参照英文版说明书, 以英文说明书为准!

下面只是一种推荐的方法, 每个研究者应根据不同的细胞密度、融合培养基和融合前和融合后的不同处理进行实验, 并参考相关文献。Ohnishi 等(BTX 书目#218)和 Ruzin(BTX 书目#183)成功描述了哺乳细胞的融合方案

#### 4.1 材料

##### 4.1.1 细胞

##### 4.1.2 融合液

##### 4.1.3 融合促进剂

##### 4.1.4 仪器及其他材料

- 1 含 10%胎牛血清和 2mM/Lglutamine 的 RPMI1640 或 DMEM
- 2 Trypsin blue
- 3 无菌 96 微孔板
- 4 无菌
- 5 带 10×和 40×物镜的显微镜
- 6 可选择: 2 个冰槽, 一个用于试剂
- 7 放置 BTX 仪器的水平桌或实验台
- 8 台式离心机
- 9 无菌圆锥试管
- 10 可用的高压灭菌锅

#### 4.2 融合用小鼠细胞的预处理

#### 4.3 融合程序

最优融合参数的建立可能花费一些时间, 并且对每种新的骨髓瘤/淋巴细胞对都必须进行实验。融合通常在室温下进行, 在融合过程中细胞悬浮液也可以放置冰上。此外, 也可以在实际的操作过程中, 使融合槽放置在冰槽上。融合前必须浓缩细胞, 并且用非电解质溶液洗涤。

##### 4.3.1 使用标准的 0.3M 甘露醇 (MANNITOL) 的融合

骨髓瘤细胞和淋巴细胞以 1: 4 的比率混合, 混合液 1000rpm 离心 6 分钟得到细胞沉淀, 弃去上清液, 加入无菌 0.3M 甘露醇 (pH 7-7.3)。

细胞用无菌 0.3M 甘露醇洗涤 2 次, 重新悬浮细胞使密度为  $2 \times 10^6$ /ml 备用。细胞在 0.3M 甘露醇只能保留 2 小时。因此, 在实验中, 准备数个细胞沉淀可能是必需的。

##### 4.3.2 使用葡萄糖 (GLUCOSE) 的融合

也可选择其他的非电解质缓冲液如 0.3M 葡萄糖 (pH 7-7.3) 作为标准的 0.3M 甘露醇的替代, 这种情况只需用糖类代替甘露醇, 除非细胞可以在葡萄糖中保存 4 小时。

##### 4.3.3 融合促进剂 (ELECTIVE)

#### 4.4 标准 0.3M 甘露醇、葡萄糖和相关糖类的融合后程序

1. 融合后，在无菌条件下用移液管小心的把细胞悬浮液从融合槽转移到无菌试管。加 10 (500) ml 含 10% 胎牛血清和 2mM/Lglutamine 的 RPMI1640 或 DMEM，静置 15 分钟。
2. 500rpm 离心 5 分钟，弃去上清液。小心的用培养基重新悬浮细胞，把细胞转移到 96 微孔板，使每孔有 2×10<sup>5</sup> 个细胞 (0.2 ml/孔)。检查所有的孔，确定有足够的培养基。
3. 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 中孵育过夜
4. 第二天取出一半的培养基，并加入 HAT 培养基。在第 4、7、10 天，再取出一半的培养基，并加 HAT 培养基。也可以给细胞补充饲养层或其他的生长因子。
5. 每天都检查 HAT 培养基的筛选情况。一旦观察到克隆形成，就开始在膨大的第一时期提供 HAT 培养基。

#### 4.5 提高融合产物的产量的程序

按以上方法准备好用于融合的细胞后，下面的程序有助于优化融合参数。这一点对于没有过去实验数据的融合的细胞系很重要。

- 1.用 Microslide 确定仪器参数
- 2.设置 AC Voltage (1)和 DC Voltage(6)为零
- 3.设置 AC Pulse Length (2)和 DC Pulse Length (5)零
- 4.在电极间隙中加入细胞悬液
- 5.增加 AC Voltage 为 10V
- 6.按一下手动按钮 (12)，观察 30 秒。如果细胞没有移动，每次 10 V 逐渐增加交流电压 (AC Voltage) 直到看到细胞移动。
- 7.如果看到加热或蒸干现象，就改变细胞悬浮液。
- 8.若改变细胞悬液，关闭排列信号。第二次按一下手动按钮 (12) (90 秒限制)。只要红色的指示灯在亮着，信号就在作用中。
9. AC 电压和脉冲时间要一直试验到在 10-20 秒内细胞形成二聚体的比率相当高。记录设置条件。
- 10.设置 AC 脉冲时间在几分钟内都可观察到排列的值
- 11.设置融合后 AC 脉冲时间 (3) 直到 9 秒，使细胞在电融合后保持成串。
- 12.根据细胞的生活力优化系统参数。使用最早得到的基本参数设置和用修改的参数设置作数个实验组  
每个实验组的细胞在含 10% 胎牛血清、次黄嘌呤、胸腺嘧啶脱氧核苷和 2mM/Lglutamine 的 RPMI1640 或 DMEM 中培养 4 天。每天都用 trypan blue exclusion 检测部分培养细胞的活力。选择 4 天后细胞活力最高的那组参数设置。
- 13.研究细胞活力的系统参数应按以下进行：  
每次按 20% 的大小改变排列电压 (Alignment Voltage) 和脉冲时间。电压高要求时间短。
- 14.按 20% 逐步改变 DC 电压和脉冲时间。
- 15.试验融合后 AC 脉冲时间时细胞在融合后仍在一起。

## 第五节 服务与保修

### 获取服务：

1. 保修期内的服务：
  - ✓ 请致电服务维修部门，并将所发现的问题以文本的方式传真到维修部门；
  - ✓ 依照维修部门的建议，进行调节和观察；
  - ✓ 如果问题仍未解决，请按照维修部门的通知，将仪器装箱回运到厂家维修部门进行专业维修。

**如果用户未经维修部门授权，自行将仪器进行解体维修，将失去保修权利！**

2. 保修期外的服务：
  - ✓ 请致电服务维修部门，并将所发现的问题以文本的方式传真到维修部门；

- ✓ 依照维修部门的建议，进行调节和观察；
- ✓ 如果问题解决，将没有费用发生。
- ✓ 如果问题仍未解决，请按照维修部门的通知，将仪器装箱回运到厂家维修部门进行专业维修；
- ✓ 此时发生的费用，将至少包含运费，维修硬件所产生的元件费用。

**如果出现任何问题，请与维修服务部门联系！**

***EASTWIN***

