

小鼠肿瘤组织温和酶解试剂盒说明书

1 产品信息

产品名称	产品型号	产品规格
小鼠肿瘤组织温和酶解试剂盒	DHTE-5001	50 T

2 产品描述

小鼠肿瘤组织温和酶解试剂盒可以将小鼠移植瘤组织温和、快速、高效地制备成单细胞悬液。这一优化方案能够获得尽可能多、细胞活率高的单细胞样本，同时保留细胞重要的表面抗原表位。获得的单细胞悬液可继续用于肿瘤细胞或 TIL (肿瘤浸润淋巴细胞) 的培养或细胞分选等下游实验应用。

主要原理：通过机械剪切和酶消化细胞外基质（维持组织结构完整性）相结合的方法，将肿瘤组织制备成单细胞悬液。瑞沃德单细胞悬液制备仪主要发挥机械解离作用，而肿瘤组织温和解离试剂盒则主要是通过酶解消化组织。解离后用细胞滤器过滤样本，以去除样本中的组织残渣，从而获得单细胞悬液，获得的细胞可立即用于后续实验，如原代细胞培养、细胞分选、单细胞测序等。

3 产品成分

共 5 瓶试剂，包括：

- 1 瓶酶 A 试剂（冻干粉）；
- 1 瓶酶 B 试剂（冻干粉）；
- 1 瓶酶 C 试剂（冻干粉）；
- 1 瓶 8 mL Buffer B 缓冲液；
- 1 瓶 3 mL Buffer C 缓冲液。

4 测试容量

可以进行 50 次肿瘤组织解离，每次处理 0.01 ~ 1.0 g 肿瘤组织。

5 运输和保存

2 ~ 8°C 冰袋运输；

试剂盒按组份分开存储，酶 C 试剂 -25 ~ -15°C 存储，其余组份 2 ~ 8°C 存储，有效期 12 个月。

6 试剂与仪器要求

RPMI 1640 或 DMEM；

（可选）红细胞裂解液(索莱宝：#R1010)；

70 μ m 细胞滤器；

恒温振荡水浴锅；

单细胞悬液制备仪 DSC-400（瑞沃德）；

组织处理管*（瑞沃德）；

（可选）HJ-400 加热套（瑞沃德）。

7 使用方法

7.1 试剂准备


- 1) 配制酶 A 溶液：分别向每瓶酶 A 冻干粉中加入 2.75 mL RPMI 1640 或 DMEM 溶解混匀，分装后冻存于 -25 ~ -15°C，溶解后的酶 A 溶液效期稳定 6 个月，避免反复冻融。如果在组织解离后进行细胞培养，则应进行无菌过滤（如用 0.22 μ m 的针头过滤器进行过滤）后再分装保存。
- 2) 配制酶 B 溶液：向酶 B 冻干粉中加入 6.875 mL Buffer B 溶解混匀。分装后冻存于 -25 ~ -15°C，溶解后的酶 B 溶液效期稳定 6 个月，避免反复冻融。如果在组织解离后进行细胞培养，则应进行无菌过滤（如用 0.22 μ m 的针头过滤器进行过滤）后再分装保存。
- 3) 配制酶 C 溶液：将酶 C 试剂（冻干粉）掌上离心机瞬时离心将干粉离心至管底，用 1.375 mL Buffer C 试剂溶解酶 C 瓶中的冻干粉。分装后冻存于 -25 ~ -15°C，溶解后的酶 C 溶液效期稳定 6 个月，避免反复冻融。如果在组织解离后进行细胞培养，则应进行无菌过滤（如用 0.22 μ m 的针头过滤器进行过滤）后再分装保存。

7.2 肿瘤组织温和酶解方案

7.2.1 使用带有 HJ-400 加热套的单细胞悬液制备仪 DSC-400

- 1) 向组织处理管中加入 2.3 mL RPMI 1640 或 DMEM、50 μ L 酶 A、125 μ L 酶 B 和 25 μ L 酶 C，配制混合酶溶液。
- 2) 从小鼠中取下肿瘤块，并剪成 2~4 mm 大小的小块，用 RPMI 1640 或 DMEM 暂存组织块，用电子天平称取目的质量的组织块。
- 3) 将肿瘤组织转移至装有混合酶溶液的组织处理管中。
- 4) 拧紧组织处理管，倒置，安装到单细胞悬液制备仪 DSC-400 的套管中，并装上 HJ-400 加热套（注意：确保样本材料位于转子/定子所在的区域）。
- 5) 质地柔软肿瘤组织，如解离黑色素瘤（由 B16 细胞系诱发）或者结肠肿瘤（由 CT26.WT 细胞系诱发），运行程序 **M_Tumor_Heater_1**；质地坚硬的肿瘤组织，如解离乳腺肿瘤（由 4T1 细胞系诱发）或者质地中等硬度的肺脏肿瘤组织（由 LLC 细胞系诱发），运行程序 **M_Tumor_Heater_2**。
- 6) （可选）对于一些质地较硬组织，在运行 **M_Tumor_Heater_2** 程序后可能仍残留一些较大的组织块。为了进一步增加细胞得率，将组织处理管中上清液全部转移至新的 15 mL 离心管中，仅留下未消化的组织块。在含残留组织块的组织处理管中加入 4 mL RPMI 1640 或 DMEM 培养基，将含有剩余组织块的组织处理管倒置再次安装到单细胞悬液制备仪 DSC-400 的套管中，且不装上 HJ-400 加热套，直接运行 **Mouse_Tumor_3**，并将组织处理管中细胞悬液同之前 15 mL 离心管中的上清液合并。
- 7) 程序运行结束后接着 7.2.2 中步骤 11) 继续操作至结束。

7.2.2 仅使用单细胞悬液制备仪 DSC-400

- 1) 向组织处理管中加入 2.3 mL RPMI 1640 或 DMEM、50 μ L 酶 A、125 μ L 酶 B 和 25 μ L 酶 C，配制混合酶溶液。
- 2) 从小鼠中取下肿瘤块，并剪成 2~4 mm 大小的小块，用 RPMI 1640 或 DMEM 暂存组织块，用电子天平称取目的质量的组织块。
- 3) 将肿瘤组织转移至装有混合酶溶液的组织处理管中。
- 4) 拧紧组织处理管，倒置，安装到单细胞悬液制备仪 DSC-400 的套管中（注意：确保样本材料位于转子/定子所在的区域）。
- 5) 运行程序 **Mouse_Tumor_1**。
- 6) 程序结束后，从单细胞悬液制备仪 DSC-400 上取下组织处理管。
- 7) 将组织处理管放到恒温振荡水浴锅中，150 rpm 连续旋转，37°C 孵育 40 分钟。注意始终保持组织处理管倒置，以避免组织残留在管壁上造成浪费。
- 8) 孵育完毕后，将组织处理管倒置，安装到单细胞悬液制备仪 DSC-400 的套管中。（注意：确保样本材料位于转子/定子所在的区域）。
- 9) 运行程序 **Mouse_Tumor_2**。
 **注意：**质地柔软肿瘤组织，如解离黑色素瘤（由 B16 细胞系诱发）或者结肠肿瘤（由 CT26.WT 细胞系诱发），程序 **Mouse_Tumor_2** 运行 1 次；质地坚硬的肿瘤组织，如解离乳腺肿瘤（由 4T1 细胞系诱发）或者质地中等硬度的肺脏肿瘤组织（由 LLC 细胞系诱发），程序 **Mouse_Tumor_2** 运行 2 次。
- 10) （可选）对于一些质地较硬组织，在运行 **Mouse_Tumor_2** 程序 2 次后可能仍残留一些较大的组织块。为了进一步增加细胞得率，将组织处理管中上清液全部转移至新的 15 mL 离心管中，仅留下未消化的组织块。在含残留组织块的组织处理管中加入 4 mL RPMI 1640 或 DMEM 培养基，将含有剩余组织块的组织处理管倒置再次安装到单细胞悬液制备仪 DSC-400 的套管中，运行 **Mouse_Tumor_3**，并将组织处理管中细胞悬液同之前 15 mL 离心管中的上清液合并。
- 11) 用 1 mL RPMI 1640 或 DMEM 培养基润湿 70 μ m 细胞滤器，用润湿后的 70 μ m 细胞滤器过滤细胞悬液样本，50 mL 离心管收集细胞悬液。
- 12) 用 10 mL RPMI 1640 或 DMEM 冲洗组织处理管，并滤过 70 μ m 滤器，收集于步骤 11) 中的 50 mL 离心管中。
- 13) 将细胞悬液 500 \times g 离心 5 分钟，彻底弃去上清。
- 14) 用 RPMI 1640 或 DMEM 重悬细胞至所需体积，用于后续实验。
- 15) （可选）如要去除红细胞，采用红细胞裂解液（索莱宝：#R1010）2 mL 对步骤 14) 处理后的细胞进行重悬，然后放置冰上孵育 3~5 min，接着用 6 mL 的 RPMI 1640 或 DMEM 或 PBS 重悬，将细胞悬液 500 \times g 离心 5 分钟，彻底弃去上清。

8 注意事项

- 1) 本试剂盒有效期为 12 个月，瑞沃德不保证过期产品的有效性。
- 2) 如组织解离后进行下游细胞培养，应保证在无菌条件下完成所有操作。
- 3) 每处理 0.01~1.0 g 肿瘤组织大约需要 2.5 mL 混合酶溶液酶解消化处理。
- 4) 为了分析肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL)，建议将酶混合物中酶 B 的含量降低至 20% (如添加 25 μ L 酶 B，减少酶 B 的含量)，有助于更好保护细胞表面表位，但可能对细胞产量和细胞活率有轻微影响。
- 5) 由于天气原因收货时即使冰袋已溶解也不影响试剂盒性能，该试剂盒已经过运输测试。

*注意：组织处理管不在美国销售。

©2022 深圳市瑞沃德生命科技有限公司，版权所有，保留所有权利。

深圳市瑞沃德生命科技有限公司

网址：www.rwds.com

地址：深圳市南山区西丽街道西丽社区留新四路万科云城三期C区九栋A座1901房

邮编：518000

电话：400-966-9516

传真：+86-755-86146750

7*24 小时售后热线：+86-755-86111281

售后邮箱：service@rwds.com