

大小鼠成年脑组织温和酶解试剂盒说明书

产品信息

产品名称	产品型号	产品规格
大小鼠成年脑组织温和酶解试剂盒	DHABE-5003	50 T

产品描述

本产品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，将大小鼠成年脑组织、海马组织、皮层组织和脊髓组织（大小鼠周龄 P>7，主要集中在 P9 ~ 12 Week）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。

本产品可搭配 RWD 单细胞悬液制备仪使用，仪器主要发挥机械解离作用，大小鼠成年脑组织温和酶解试剂盒则主要是通过酶消化组织，解离后用细胞滤器过滤样本，以去除样本中的组织残渣，同时本试剂盒配备了碎片高效去除试剂，有效去除脑组织中的髓鞘碎片。本产品也可以直接按照手工酶解方案获得单细胞悬液。

本产品获得的单细胞悬液可继续用于后续实验，如原代细胞培养、细胞分选、单细胞测序等。

产品成分

产品名称	组分名称	数量	储存条件
大小鼠成年脑组织温和酶解试剂盒	酶 A 试剂（干粉）	1 瓶	2 ~ 8℃
	酶 B 试剂（干粉）	1 瓶	-25 ~ -15℃
	酶 C 试剂（干粉）	1 瓶	2 ~ 8℃
	Buffer A（溶液）	2 瓶	2 ~ 8℃
	Buffer B（溶液）	1 瓶	2 ~ 8℃
	碎片高效去除试剂（溶液）	1 瓶	2 ~ 8℃

测试容量

单次建议处理组织如下：

组织类型	测试容量-正式装	样本起始量
大小鼠成年脑组织	50 T	每次处理 20 ~ 500 mg
海马组织	50 T	每次处理 20 ~ 300 mg
皮层组织	50 T	每次处理 20 ~ 300 mg
脊髓组织	50 T	每次处理 20 ~ 300 mg

运输和保存

- ✧ 本产品应当 2 ~ 8℃运输。
- ✧ 酶 B 组份置于-25 ~ -15℃存储，其它组份置于 2 ~ 8℃存储。
- ✧ 酶试剂建议溶解后混匀分装保存，避免反复冻融和剧烈振荡。
- ✧ 本产品从生产之日起有效期 12 个月。

试剂与仪器要求

试剂	HBSS（含 Ca ²⁺ 和 Mg ²⁺ ）	PBS	红细胞裂解液（可选）
耗材	组织处理管(瑞沃德)	加热套（瑞沃德：# HJ-400）	70 μm 细胞滤器
	0.22 μm 针头过滤器（可选）		
仪器设备	单细胞悬液制备仪（瑞沃德）	高速冷冻离心机	恒温振荡水浴锅

实验操作

试剂准备

- 配制酶 A 溶液：用 5.5 mL HBSS（含 Ca²⁺和 Mg²⁺）溶解酶 A 试剂瓶中的粉末，溶解后直接分装-25 ~ -15℃保存(可以 37℃孵育 3~5min 帮助溶解)，避免反复冻融和剧烈振荡，该酶溶液在-25 ~ -15℃条件下可稳定保存 6 个月。
- 配制酶 B 溶液：用 2.75 mL Buffer B 溶解酶 B 试剂瓶中的粉末，溶解后直接分装-25 ~ -15℃保存，避免反复冻融和剧烈振荡，该酶溶液在-25 ~ -15℃条件下可稳定保存 6 个月。
- 配制酶 C 溶液：用 2.75 mL HBSS（含 Ca²⁺和 Mg²⁺）溶解酶 C 试剂瓶中的粉末，溶解后直接分装-25 ~ -15℃保存，避免反复冻融和剧烈振荡，该酶溶液在-25 ~ -15℃条件下可稳定保存 6 个月。

- 酶混合液配制：
按照下表配制酶 mix 1，该酶混合液现配现用。该酶 mix 1 能处理 20 ~ 500 mg 的成年脑组织，20 ~ 300 mg 的海马组织、皮层组织和脊髓组织。如果处理的成年脑组织的重量大于 500 mg，则根据脑组织重量相应的同比例加大酶 mix 1 的体积用量。每个组织处理管最大能处理 1000 mg 的大小鼠成年脑组织和 300 mg 的海马组织、皮层组织和脊髓组织。如果需要处理更大重量的上述组织，需增加组织处理管的数量。若后续需要进行细胞培养，配制酶混合液后可用 0.22 μm 的滤头进行无菌过滤处理，过滤后保证酶混合液总体积在 2 mL。

⚠ 注意：酶 A 试剂储存液需要在 37℃水浴孵育 3 ~ 5 min 后完全溶解后配制成酶 mix 1。

酶 mix 1			
酶 A 100 μL	Buffer A 1800 μL	酶 B 50 μL	酶 C 50 μL

⚠ 注意：如需测试 CD8a、Tmem119 表位，则需按照下表配制酶 mix 2，该酶混合液现配现用。该配方对表位保护较好，但会略微降低得率。

酶 mix 2		
Buffer A 1850 μL	酶 B 50 μL	酶 C 100 μL

- 酶试剂活化：将配制好的酶 mix 1 放置在 37℃水浴锅 50 ~ 100 rpm 振荡孵育 25 ~ 30 min。

⚠ 注意：酶 mix2 可直接使用，无需水浴孵育。

自动化酶解方案

- 剥离成年脑组织、海马组织（一只鼠有两片海马组织）、皮层组织或脊髓组织后需要将其放进盛有 HBSS（含 Ca²⁺和 Mg²⁺）或 PBS 的培养皿中暂存，溶液须没过组织，用合适的眼科镊轻轻地将上述组织表面的血丝尽可能去除。
- 称量成年脑组织、海马组织、皮层组织或脊髓组织的重量，先将试剂准备步骤(5)中孵育的 mix 1 加入组织处理管中，再将相应组织转移到组织处理管中（全脑组织需要用剪刀剪成 4 小块左右，

一片海马组织剪成 2 半、一个皮层组织剪成 4 小块、脊髓组织剪成 0.5 cm 长度的小段)。

(3) 拧紧组织处理管，倒置，安装到单细胞悬液制备仪的套管中，并装上加热套。

⚠ 注意：确保样本材料位于转子/定子所在的区域。

(4) 成年脑组织、皮层组织和脊髓组织运行程序 M_ABrain_Heater_2，海马组织运行程序 M_ABrain_Heater_1。

(5) 程序结束后，从单细胞悬液制备仪上取下组织处理管，倒转管子，放入离心机上瞬时甩 7 s 或者 300×g 离心 15 s，使样本组织沉到组织处理管底部。

(可选) 为了获得更多的细胞，可以用 1 mL 的移液枪，吹打混匀细胞悬液 8 次。

(6) 用 1 mL PBS 或 HBSS (含 Ca²⁺和 Mg²⁺) 润湿 70 μm 细胞滤器，用润湿后的 70 μm 细胞滤器过滤细胞悬液样本，50 mL 离心管收集细胞悬液。

(7) 用 10 mL PBS 或 HBSS (含 Ca²⁺和 Mg²⁺) 冲洗组织处理管，并滤过 70 μm 滤器，收集于步骤(6)中的 50 mL 离心管中。

(8) 将细胞悬液 300×g 离心 10 min，彻底弃去上清（此步骤用移液枪吸掉上清）。

(9) 用碎片高效去除试剂盒（瑞沃德：#DHDR-5006）进行去碎片处理。

(a) 用于处理重量范围为：20 mg ~ 1000 mg，参考下表进行去碎片处理：

组织重量	PBS 重悬细胞体积	碎片高效去除试剂体积	上层 PBS 体积	适用管子
20 ~ 100 mg	1550 μL	450 μL	2 mL	5/15mL 离心管
101 ~ 500 mg	3100 μL	900 μL	4 mL	15 mL 离心管
501 ~ 1000 mg	6200 μL	1800 μL	4 mL	15 mL 离心管

(b) 根据组织重量范围添加对应的 PBS 重悬步骤(8)中得到的细胞沉淀（尽可能吸掉上清，不能振荡重悬），并加入相应体积的碎片高效去除试剂（用 1 mL 移液枪轻轻吹打 10 次与细胞悬液混匀）和上层 PBS（沿离心管管壁慢慢滴加提前预冷的 PBS）。

(c) 然后，将细胞悬液 3000×g，4℃，升速为 9，降速为 3 进行离心 10 min（不同品牌的离心机的升降速可适当调节），离心后溶液出现分层，分为 3 层溶液，彻底弃去最上面两层，收集下层细胞，加入冷的 PBS 溶液至 10 mL（15 mL 离心管）或 5 mL（5 mL 离心管），上下轻微颠倒 3 次（不能振荡重悬），将细胞悬液 1000×g 离心 10 min 进行洗涤，彻底弃去上清。

(d) 用 PBS 或 HBSS (含 Ca²⁺和 Mg²⁺) 重悬细胞至所需体积，用于后续实验。

(可选) 如要进行红细胞去除，推荐以下红细胞裂解方法。

用 1×红细胞裂解液 1 mL 对步骤(9)处理后的细胞沉淀进行重悬，然后放置冰上孵育 2 ~ 3 min，接着用 9 mL 的 HBSS (含 Ca²⁺和 Mg²⁺) 或 PBS 重悬，将细胞悬液 300×g 离心 10 min，彻底弃去上清，用合适的培养基和缓冲液重悬细胞至所需体积，用于后续实验。

(10)用 PBS、HBSS (含 Ca²⁺和 Mg²⁺) 或其它培养基重悬细胞至所需体积，用于后续实验。

手工制备方案

(1) 剥离成年脑组织、海马组织（一只鼠有两片海马组织）、皮层组织或脊髓组织后需要将其放进盛有 HBSS (含 Ca²⁺和 Mg²⁺) 或 PBS 的培养皿中暂存，溶液须没过组织，用眼科小弯镊轻轻地将上述组织表面的血丝尽可能去除。

(2) 称量成年脑组织、海马组织、皮层组织或脊髓组织的重量，先将实验操作中试剂准备步骤(5)中孵

育的 mix 1 或 mix 2 加入 50 mL 离心管中，再将相应组织转移到 50 mL 离心管中（全脑组织需要用剪刀剪成 8 小块左右、一片海马组织剪成 4 半、一个皮层组织剪成 8 小块、脊髓组织剪成 0.2 cm 长度的小段），拧好离心管盖。

(3) 将上述步骤(2)中的 50 mL 离心管放入 37℃水浴锅中，100 rpm 进行孵育 15 min 后，用 1 mL 移液器剪掉 0.5 cm 的尖头上下吹打 20 次，然后再放入 37℃水浴锅中，100 rpm 进行孵育 15 min，孵育结束后再用 1 mL 移液器剪掉 0.5 cm 的尖头上下吹打 20 次。

(4) 参考自动化酶解方案步骤(6) ~ 步骤(10)进行后续的操作。

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) 每个组织处理管最大能处理 1000 mg 的大小鼠成年脑组织和 300 mg 的海马组织、皮层组织和脊髓组织，且当单个组织处理管处理大于 500 mg 的脑组织单位重量的脑组织获得的细胞数量会降低。

(4) 去碎片离心步骤中，升降速推荐为升 9 降 3 主要适用于艾本德和赛默飞离心机，其它品牌离心机可以参考这个升降速做预实验，确定更合适的升降速。

(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。

©2024 深圳市瑞沃德生命科技股份有限公司，版权所有，保留所有权利。

深圳市瑞沃德生命科技股份有限公司

地址：深圳市南山区西丽街道西丽社区打石一路深圳国际创新谷七栋 A 座 1901 房

(A 座 9 层、19 层、20 层，D 座 9 层) 邮编：518000

电话：0755-86111281 400 966 9516 售后邮箱：service@rwdls.com

网址：www.rwdls.com 在线商城：www.rwdmall.com