

大小鼠成年脑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 |
|-----------------|------------|------|
| 大小鼠成年脑组织温和酶解试剂盒 | DHABE-5003 | 50 T |

2 产品描述

大小鼠成年脑组织温和酶解试剂盒可以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 P9~12Week）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，可用于细胞分选、原代细胞培养等下游实验应用。

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，将大小鼠成年脑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，而大小鼠成年脑组织温和解离试剂盒则主要是通过酶消化组织，解离后用细胞过滤器过滤样本，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，从而获得较纯净单细胞悬液，适用于后续实验，如原代细胞培养、细胞分选、单细胞测序等。

3 产品成分

- 共 6 瓶试剂，包括：
- 1 瓶酶 A 试剂（干粉）；
  - 1 瓶酶 B 试剂（干粉）；
  - 2 瓶 Buffer A 试剂（溶液）；
  - 1 瓶 Buffer B 试剂（溶液）；
  - 1 瓶碎片高效去除试剂（溶液）。

4 测试容量

- 可以进行 50 次大小鼠成年脑组织、海马组织、皮层组织和脊髓组织解离。
- 每次处理 20~500 mg 大小鼠成年脑组织，20~300 mg 的海马组织，20~300 mg 的皮层组织，20~300 mg 的脊髓组织。

5 运输和保存

- 2~8℃冰袋运输；
- 试剂盒里面的一种酶组分酶 B 置于-25~-15℃存储，其它组份置于 2~8℃存储，有效期 12 个月。

6 试剂与仪器要求

- HBSS（含 Ca<sup>2+</sup>和 Mg<sup>2+</sup>）或 PBS 溶液；
- 70 μm 细胞过滤器；
- 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）；
- HJ-400 加热套（可选，瑞沃德）。

7 使用方法

7.1 酶试剂准备

7.1.1 酶干粉溶解配制

- 1) **配制酶 A 溶液：**用 5.5 mL HBSS（含 Ca<sup>2+</sup>和 Mg<sup>2+</sup>）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；
- 2) **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。

7.1.2 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。

| 酶 mix 1   |                 |          |
|-----------|-----------------|----------|
| 酶 A 100μL | Buffer A 1850μL | 酶 B 50μL |

7.1.3 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。

## 7.2 大小鼠成年脑组织温和酶解方案

- 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  $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Mg}^{2+}$ ）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 7.1.3 步骤中孵育的 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 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）；
  - 4) 成年脑组织和脊髓组织运行程序 M\_ABrain\_Heater\_2，海马组织和皮层组织运行程序 M\_ABrain\_Heater\_1；
  - 5) 程序结束后，从单细胞悬液制备仪 DSC-400 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  $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Mg}^{2+}$ ）润湿 70  $\mu\text{m}$  细胞滤器，用润湿后的 70  $\mu\text{m}$  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 5 mL PBS 或 HBSS（含  $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Mg}^{2+}$ ）冲洗组织处理管，并滤过 70  $\mu\text{m}$  滤器，收集于步骤 6）中的 50 mL 离心管中。
  - 8) 将细胞悬液 300 $\times$ g 离心 10 分钟，彻底弃去上清（此步骤用移液枪吸掉上清）；
  - 9) 用 PBS、HBSS（含  $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Mg}^{2+}$ ）或其它培养基重悬细胞至所需体积，用于后续实验。

## 7.3 去碎片处理

- 1) 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 $\mu\text{L}$ | 450 $\mu\text{L}$  | 2 mL      | 5 mL 或 15 mL 离心管 |
| 101 ~ 500 mg  | 3100 $\mu\text{L}$ | 900 $\mu\text{L}$  | 4 mL      | 15 mL 离心管        |
| 501 ~ 1000 mg | 6200 $\mu\text{L}$ | 1800 $\mu\text{L}$ | 4 mL      | 15 mL 离心管        |

- 2) 根据组织重量范围添加对应的 PBS 重悬细胞沉淀（步骤 7.2 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 体积（沿离心管管壁慢慢滴加提前预冷的 PBS）；
- 3) 然后，将细胞悬液 3000 $\times$ g，4 $^{\circ}\text{C}$ ，升速为 5，降速为 3 进行离心 10 分钟（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 $\times$ g 离心 10 分钟进行洗涤，彻底弃去上清；
- 4) 用 PBS 或 HBSS（含  $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Mg}^{2+}$ ）重悬细胞至所需体积，用于后续实验。

## 7.4 红细胞去除（可选）

如果需要红细胞去除，用 1 $\times$ 红细胞裂解液（比如 Biolegend 红细胞裂解液：#420301）1 mL 对 7.3 步骤 3）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  $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Mg}^{2+}$ ）或 PBS 重悬，将细胞悬液 300 $\times$ g 离心 10 分钟，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。

## 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) 酶 A 试剂储存液需要在 37 $^{\circ}\text{C}$  水浴孵育 3~5 min 后完全溶解后配制酶 mix 1；
- 4) 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；
- 5) 去碎片离心步骤中，升降速推荐为升 5 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；
- 6) 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.rwdLs.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@rwdLs.com