

## 大小鼠脂肪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
大小鼠脂肪组织温和酶解试剂盒	DHAE-5010	50 T

### 2 产品描述

大小鼠脂肪组织温和酶解试剂盒可将脂肪组织温和、快速及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。制备获得的单细胞悬液为非成熟的脂肪细胞，主要用于 SVF 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，将脂肪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，而脂肪组织温和酶解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 SVF 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 瓶缓冲液 B 试剂；
- 1 瓶缓冲液 C 试剂。

### 4 测试容量

可以进行至少 50 次样本范围内的脂肪组织解离，对于白脂肪组织每次可处理 0.1 g ~ 1.0 g（不含），对于棕脂肪组织或者米脂肪组织每次可处理 0.1 g ~ 0.5 g（不含），根据处理的组织类型不同，加入的酶混合液体积不同，具体请参考表 4-1。

表 4-1

样本种类	酶混合液
白脂肪 0.1 g ~ 1.0 g（不含）	2.4 mL Hanks（含钙镁）+ 75 $\mu$ L 酶 A + 75 $\mu$ L 酶 B + 12.5 $\mu$ L 酶 C
米/棕脂肪 0.1 g ~ 0.5 g（不含）	2.3 mL Hanks（含钙镁）+ 100 $\mu$ L 酶 A + 100 $\mu$ L 酶 B + 25 $\mu$ L 酶 C

若后续需要进行原代培养，则配制酶混合液后用 0.22  $\mu$ m 的滤头进行无菌过滤，过滤后保证酶混合液的总体积在 2.5 mL。若需消化 1.0 g 以上白脂肪组织、500 mg 以上的米脂肪或 500 mg 以上的棕脂肪组织时，建议分配至多个组织处理管进行实验。

### 5 运输和保存

2 ~ 8°C 冰袋运输；

到货后将试剂盒按组分分开储存，酶 C 试剂 -25 ~ -15°C 保存，其余组分保存在 2 ~ 8°C，有效期 12 个月。

## 6 试剂与仪器要求

Hanks（含钙镁）（索莱宝：#H1020）或 RPMI 1640；

100  $\mu\text{m}$  细胞滤器；

（可选）40  $\mu\text{m}$  细胞滤器；

单细胞悬液制备仪 DSC-400/DSC-800（瑞沃德）；

恒温振荡水浴锅；

组织处理管\*（瑞沃德）；

HJ-400 加热套（瑞沃德）；

（可选）红细胞裂解液(索莱宝：#R1010)；

（可选）0.22  $\mu\text{m}$  针头过滤器。

## 7 使用方法

### 7.1 试剂准备


- 1) 配制酶 A 溶液：向装有酶 A 冻干粉的小瓶中加入 6 mL 的 Hanks(含钙镁)或 RPMI 1640 混匀；
- 2) 配制酶 B 溶液：向装有酶 B 冻干粉的小瓶中加入 6 mL 的缓冲液 B 混匀；
- 3) 配制酶 C 溶液：向装有酶 C 冻干粉的小瓶中加入 1.5 mL 的缓冲液 C 混匀。

可选择 15 mL 离心管辅助溶解酶 A 和酶 B 溶液，溶解后的各组分准备适量管子分装，保存在  $-25 \sim -15^{\circ}\text{C}$  下，避免反复冻融，溶解后的组分可稳定保存 6 个月。


### 7.2 大小鼠脂肪组织温和酶解方案


#### 7.2.1 使用带有 HJ-400 加热套的 DSC-400/DSC-800 单细胞悬液制备仪

- 1) 按照表 4-1 所述体系向组织处理管中加入 Hanks 缓冲液（含钙镁）及酶解试剂组分，配制成混合酶溶液。

 注：无 Hanks 缓冲液可暂用 RPMI 1640 基础培养基替代。

- 2) 取脂肪组织反复用 PBS 漂洗干净后，用装有 Hanks 缓冲液（含钙镁）或 RPMI 1640 的容器暂存组织块，剪成 2~4 mm 大小的小块，用电子天平称取目的质量的组织块。

 注：脂肪组织应现取现用，尽量除去各脂肪组织中可能掺杂的淋巴结、血渍以及多余结缔组织隔膜等。

- 3) 将剪碎的脂肪组织块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/ DSC-800（带加热套）的套管中。  
 注：确保样本材料位于转子/定子所在的区域。
- 5) 运行程序 M-Adipose-Heater-1。
- 6) 程序结束后，从单细胞悬液制备仪 DSC-400/ DSC-800（带加热套）上取下组织处理管，接着 7.2.2 中步骤 10) 继续操作至结束。

#### 7.2.2 仅使用 DSC-400/DSC-800 单细胞悬液制备仪

- 1) 按照表 4-1 所述体系向组织处理管中加入 Hanks 缓冲液（含钙镁）及酶解试剂组分，配制成混合酶溶液。

 注：无 Hanks 缓冲液可暂用 RPMI 1640 基础培养基替代。

- 2) 取脂肪组织反复用 PBS 漂洗干净后, 用装有 Hanks 缓冲液 (含钙镁) 或 RPMI 1640 的容器暂存组织块, 剪成 2~4 mm 大小的小块, 用电子天平称取目的质量的组织块。  
 注: 脂肪组织应现取现用, 尽量除去各脂肪组织中可能掺杂的淋巴结、血渍以及多余结缔组织隔膜等。
- 3) 将剪碎的脂肪组织块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, 放到恒温振荡水浴锅中, 100 rpm 连续旋转, 37°C 孵育 20 min。  
 注: 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。
- 5) 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/DSC-800 上。  
 注: 确保样本材料位于转子/定子所在的区域。
- 6) 运行程序 M-Adipose-01, 程序结束后, 从单细胞悬液制备仪上取下组织处理管。
- 7) 将组织处理管倒置, 放到恒温振荡水浴锅中, 100 rpm 连续旋转, 37°C 孵育 20 min。  
 注: 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/DSC-800 上。  
 注: 确保样本材料位于转子/定子所在的区域。
- 9) 再次运行程序 M-Adipose-01, 程序结束后, 从单细胞悬液制备仪上取下组织处理管。
- 10) 用 1 mL Hanks 缓存液 (含钙镁) 或 RPMI 1640 培养基润湿 100  $\mu$ m 细胞滤器, 用润湿后的 100  $\mu$ m 细胞滤器过滤细胞悬液样本, 50 mL 离心管收集细胞悬液。
- 11) 用 20 mL Hanks 缓存液 (含钙镁) 或 RPMI 1640 冲洗组织处理管并滤过 100  $\mu$ m 滤器, 收集于步骤 10 中的 50 mL 离心管中。  
 注: 棕脂肪组织过筛后若较多残留, 可辅助用枪头吸取缓冲液或 RPMI 1640 冲洗筛网。
- 12) 将细胞悬液 300 $\times$ g 离心 10 min, 小心的吸弃所有上清 (包括最上层漂浮的油脂、次层乳状成熟的脂肪细胞和中间的混合液体), 为避免底层 SVF 细胞沉淀的损失, 注意不要直接倾倒。
- 13) 用适宜的缓冲液或培养基重悬细胞至所需体积, 用于后续进一步的实验应用。米脂肪组织细胞悬液可能会出现絮状物, 可选择直接用 40  $\mu$ m 的细胞滤器过滤细胞悬液后使用。
- 14) (可选) 如要去除红细胞, 采用红细胞裂解液 (索莱宝: #R1010) 1 mL 对步骤 12 的细胞沉淀进行重悬, 然后放置冰上孵育 2 min 左右, 接着加入 6 mL 以上的 RPMI 1640 终止, 将细胞悬液 300 $\times$ g 离心 10 min, 彻底弃去上清后重悬使用。

## 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, 应保证全程在无菌条件下完成所有操作。
- 3) 白脂肪组织 (eWAT) 为内脏脂肪, 多取自腹腔内睾丸和附睾处, 注意取材小心剔除粘连的其他组织和杂质; 棕脂肪组织 (BAT) 多取自皮下肩胛骨中间, 被米脂肪覆盖, 注意剪切去除米脂肪以及棕脂肪中间的薄膜组织; 米脂肪组织 (iWAT) 为皮下脂肪组织, 多取自腹股沟处, 仔细剔除米脂肪中的淋巴结和四周的薄膜; 脂肪组织处理干净可避免杂细胞干扰, 前期处理过程尽量泡在 Hanks 缓存液 (含钙镁) 或 RPMI 1640 中, 动作尽量轻柔迅速。
- 4) 请按照建议组织重量投入组织, 避免出现组织残留过多, 消化不充分。

- 5) 50 mL 离心管离心后弃上清，可能会导致部分细胞的损失，为离心后收集更多的细胞，操作后可换 15 mL 离心管进行离心收集细胞。
- 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，已通过运输测试。
- \*注意：组织处理管不在美国销售。

©2023 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