

大小鼠脂肪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
大小鼠脂肪组织温和酶解试剂盒	DHAE-5010	50 T

产品描述

本产品可将脂肪组织温和、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、细胞分选、单细胞测序等下游实验应用。

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。

产品成分

产品名称	组分名称	数量	储存条件
大小鼠脂肪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	2 ~ 8℃
	酶 C 试剂（干粉）	1 瓶	-25 ~ -15℃
	Buffer B（溶液）	1 瓶	2 ~ 8℃
	Buffer C（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
白脂肪组织	66 T	每次处理 100 ~ 1000 mg
米/棕脂肪组织	50 T	每次处理 50 ~ 500 mg

运输和保存

- ✧ 本产品应当 2 ~ 8℃ 运输。
- ✧ 本试剂盒因各组分储存温度不同分为两个包装，请按照各包装盒贴温度标识进行分开存储。
- ✧ 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 缓冲液（含 Ca ²⁺ 和 Mg ²⁺ ）	PBS 缓冲液	RPMI 1640 或 DMEM 培养基
	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）	100 μm 细胞滤器
	40 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）	恒温振荡水浴锅	涡旋振荡仪

实验操作

试剂准备

- 配制酶 A 溶液：用 6 mL 的 HBSS 缓冲液（含 Ca²⁺和 Mg²⁺）溶解酶 A 试剂瓶中的粉末，溶解后直接分装至 -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 B 溶液：用 6 mL 的 Buffer B 溶解酶 B 试剂瓶中的粉末，溶解后直接分装至 -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 1.5 mL 的 Buffer C 溶解酶 C 试剂瓶中的粉末，溶解后直接分装至 -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：
按照下表配制酶混合液于组织处理管中，根据处理的组织类型不同，配制酶混合液的组分体积不同，该酶混合液现配现用，对于白脂肪组织每次可处理 0.1 ~ 1.0 g，对于棕脂肪组织或者米脂肪组织每次可处理 0.05 ~ 0.5 g，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 2.5 mL。

样本种类	酶混合液			
白脂肪	HBSS 缓冲液（含 Ca ²⁺ 和 Mg ²⁺ ）	2.4 mL	酶 A 75 μL	酶 B 75 μL 酶 C 12.5 μL
米/棕脂肪	HBSS 缓冲液（含 Ca ²⁺ 和 Mg ²⁺ ）	2.3 mL	酶 A 100 μL	酶 B 100 μL 酶 C 25 μL

⚠ 注意：无 HBSS 缓冲液（含 Ca²⁺和 Mg²⁺）可暂用 RPMI 1640 培养基替代。

自动化酶解方案

- 根据“试剂准备”中的描述在组织处理管中配制酶混合液。
- 获取的脂肪组织反复用 PBS 缓冲液漂洗干净后，用装有 RPMI 1640 或 DMEM 培养基的容器暂存组织块，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。
⚠ 注意：脂肪组织应现取现用，尽量除去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，注意尽可能保留基质血管部分。
- 将剪碎的脂肪组织块转移至装有酶混合液的组织处理管中，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。
- 白脂肪组织运行程序 M_Adipose_Heater_1，棕脂肪组织和米脂肪组织运行程序 M_Adipose_Heater_2。

- (5) 程序结束后，从单细胞悬液制备仪上取下组织处理管。
- (6) 用 1 mL RPMI 1640 或 DMEM 培养基润湿 100 μm 细胞滤器，用润湿后的 100 μm 细胞滤器过滤细胞悬液，50 mL 离心管收集细胞悬液。
- (7) 用 10 mL RPMI 1640 或 DMEM 培养基冲洗组织处理管并滤过 100 μm 细胞滤器，收集于步骤 (6) 中的 50 mL 离心管中。
- ⚠ 注意：对于质地密度稍大的脂肪组织过筛后若发现有较多残留，可用枪头吸取 RPMI 1640 或 DMEM 培养基对未消化的组织块吹打 3 ~ 5 次，帮助释放更多单细胞，但该部分细胞悬液活率会稍低。
- (8) 当组织量较少时，获得的细胞量可能会偏少，为减少细胞的损失，可选择收集所有细胞悬液于 15 mL 离心管进行 300×g 离心 10 min，离心结束后小心的吸弃上清。
- ⚠ 注意：为避免底层 SVF 细胞沉淀的损失注意不要直接倾倒。
- (可选) 去除红细胞
- 采用 0.5 ~ 1 mL 红细胞裂解液对步骤 (8) 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 10 mL 的 RPMI 1640 或 DMEM 培养基重悬，将细胞悬液 500×g 离心 5 min，离心结束后彻底弃去上清。
- (9) 用 RPMI 1640 或 DMEM 培养基或其它缓冲液重悬细胞至所需体积，用于后续实验。
- ⚠ 注意：若细胞悬液出现絮状物，可选择轻柔吹打细胞悬液后直接用 40 μm 细胞滤器过滤细胞悬液后使用。

手工酶解方案

- (1) 根据“试剂准备”中的酶混合液配制方法向 50 mL 离心管中加入 HBSS 缓冲液 (含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+}) 及酶解试剂组分，配制成酶混合液。
- ⚠ 注意：无 HBSS 缓冲液 (含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+}) 可暂用 RPMI 1640 培养基替代。
- (2) 获取的脂肪组织反复用 PBS 缓冲液漂洗干净后，用装有 RPMI 1640 或 DMEM 培养基的容器暂存组织块，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。
- ⚠ 注意：脂肪组织应现取现用，尽量除去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，注意尽可能保留基质血管部分。
- (3) 将剪碎的脂肪组织块转移至装有酶混合液的离心管中，放入 37°C 水浴锅中进行孵育消化。
- (4) 白脂肪组织孵育 10 min 后需要在涡旋振荡仪上振荡 10 ~ 15 s，混匀组织和酶混合液后，继续放入 37°C 水浴锅中孵育消化，总共消化时长不超过 40 min，期间涡旋振荡 2 ~ 3 次，组织起始量低的基本可完全消化完成，当样本量较大的消化结束有组织残留可用 1 mL 移液器配套宽口枪头或者剪掉 0.5 cm 枪头的尖头枪头上下吹打；棕脂肪组织需在 37°C、60 rpm 的恒温振荡水浴锅中振荡消化，每隔 10 min 取出在涡旋振荡仪上振荡 10 ~ 15 s，总时间在 40 ~ 50 min，消化期间密切观察避免消化过度。
- (5) 消化结束后用 10 mL RPMI 1640 或 DMEM 培养基终止消化，
- (6) 参考“自动化酶解方案”步骤 (6) ~ 步骤 (9) 进行后续的操作，过筛时观察到的残留可用 1 mL 的枪头吸取适量培养基在筛网上适当吹打研磨。
- ⚠ 注意：手工酶解方案可能存在细胞数量波动与组织消化不完全情况，可根据实际情况适当调整。

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) 白脂肪组织 (eWAT) 为内脏脂肪，多取自腹腔内睾丸和附睾等性腺处，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缓冲液或培养基中，动作轻柔迅速。
- (4) SVF 细胞为基质血管成分细胞，脂肪组织中缠绕的血管是目的细胞主要来源，注意前期取材保留尽可能多的基质血管。
- (5) 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。
- (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。

©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