

通用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 |
|-------------|-----------|--------------------|
| 通用组织温和酶解试剂盒 | DHGT-5004 | 50 T (具体参考处理的组织类型) |

2 产品描述

通用组织温和酶解试剂盒可以将成年小鼠 (6~8 Weeks) 脾脏、肺脏、肝脏、肾脏、心脏 (非心肌细胞)、淋巴结、睾丸组织以及出生在 P1~P3 天内的新生大小鼠心脏组织 (心肌细胞) 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, 将成年小鼠或新生大小鼠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, 而通用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 2 瓶试剂, 包括:

1 瓶 2.1 ml 酶 A 试剂 (溶液);

1 瓶 1.4 ml 酶 B 试剂 (溶液)。

4 测试容量

根据处理的组织类型, 本产品可以进行的组织解离略有差别, 具体请参考表 4-1。

| 组织类型 | 测试容量 | 样本起始量 |
|---------|------|-----------------------|
| 成年小鼠脾脏 | 50 T | 每次处理 40~200 mg 脾脏组织 |
| 成年小鼠肺脏 | 50 T | 每次处理 100~300 mg 肺脏组织 |
| 成年小鼠肝脏 | 17 T | 每次处理 500~1200 mg 肝脏组织 |
| 成年小鼠肾脏 | 25 T | 每次处理 200~500 mg 肾脏组织 |
| 成年小鼠心脏 | 37 T | 每次处理 100~500 mg 心脏组织 |
| 新生大小鼠心脏 | 37 T | 每次处理 50~300 mg 心脏组织 |
| 成年小鼠淋巴结 | 50 T | 每次处理 20~200 mg 淋巴结组织 |
| 成年小鼠睾丸 | 50 T | 每次处理 50~200 mg 睾丸组织 |

表 4-1

5 运输和保存

干冰运输;

试剂盒按组份分装存储, 酶 A、酶 B 试剂组份放在 -20°C 冰箱存储, 有效期 6 个月。

6 试剂与仪器要求

DMEM、RPMI 1640、PBS 溶液;

(可选) 红细胞裂解液(索莱宝: #R1010);

(可选) 碎片高效去除试剂盒 (瑞沃德#DHDR-5006);

40 μm、70 μm 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)。

7 使用方法

7.1 试剂分装

准备适量的 EP 管，将酶 A、酶 B 等量分装，避免使用时反复冻融，并放置于-20℃ 存储。对于组织分离后的细胞培养实验，酶 A、酶 B 在应用前应经过无菌过滤。

7.2 组织温和酶解方案

1) 根据处理的组织类型的不同，在组织处理管中配置相应的酶混合溶液，具体配置比例参考表 7-1:

| 组织类型 | RPMI 1640 / DMEM | 酶 A | 酶 B |
|---------------|------------------|---------|-------|
| 成年小鼠脾脏、淋巴结、睾丸 | 2.438 mL | 37.5 μL | 25 μL |
| 成年小鼠肺脏 | 2.45 mL | 25 μL | 25 μL |
| 成年小鼠肝脏 | 4.84 mL | 110 μL | 50 μL |
| 成年小鼠肾脏 | 4.875 mL | 75 μL | 50 μL |
| 成年小鼠心脏 | 2.425 mL | 50 μL | 25 μL |
| 新生大小鼠心脏 | 2.425 mL | 50 μL | 25 μL |

表 7-1

- 从小鼠或新生大小鼠中取下相应组织，剪去多余的其他组织，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；
- 将相应组织转移至装有混合酶溶液的组织处理管中；
- 拧紧组织处理管，倒置安装到单细胞悬液制备仪 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）；
- 根据处理的组织类型的不同，运行相应组织的不带加热处理程序表 7-2，如需运行相应组织的带加热处理程序表 7-3，具体程序例参考下表：

| 组织类型 | 程序名称 | 运行次数 |
|------------|----------------|------|
| 成年小鼠脾脏、淋巴结 | Mouse_Spleen_1 | 1 次 |
| 成年小鼠肺脏 | Mouse_Lung_1 | 2 次 |
| 成年小鼠肝脏 | Mouse_Liver_1 | 1 次 |
| 成年小鼠肾脏、睾丸 | Mouse_kidney_1 | 1 次 |
| 成年小鼠心脏 | Mouse_Heart_1 | 1 次 |

表 7-2

注：新生大小鼠心脏无不带加热程序，仅有加热程序。

| 组织类型 | 程序名称 | 运行次数 |
|------------|---------------------|------|
| 成年小鼠脾脏、淋巴结 | M_Spleen_Heater_1 | 1 次 |
| 成年小鼠肺脏 | M_Lung_Heater_1 | 1 次 |
| 成年小鼠肝脏 | M_Liver_Heater_1 | 1 次 |
| 成年小鼠肾脏、睾丸 | M_Kidney_Heater_1 | 1 次 |
| 成年小鼠心脏 | M_AHeart_Heater_1 | 1 次 |
| 新生大小鼠心脏 | M_NeoHeart_Heater_1 | 1 次 |

表 7-3

- 程序结束后，从单细胞悬液制备仪 DSC-400 上取下组织处理管（如运行带加热的处理程序可直接跳至第 10 步）；

- 7) 将组织处理管放到恒温振荡水浴锅中，根据处理组织类型的不同，在恒温振荡水浴锅中孵育的时间不一样，具体参考表 7-4，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；

| 组织类型 | 振荡速度 | 孵育时间 | 孵育温度 |
|------------|--------|--------|------|
| 成年小鼠脾脏、淋巴结 | 50 rpm | 15 min | 37°C |
| 成年小鼠肺脏 | 50 rpm | 15 min | 37°C |
| 成年小鼠肝脏 | 50 rpm | 30 min | 37°C |
| 成年小鼠肾脏、睾丸 | 50 rpm | 30 min | 37°C |
| 成年小鼠心脏 | 50 rpm | 15 min | 37°C |

表 7-4

- 8) 孵育完毕后，将组织处理管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) 再次运行程序，根据处理的组织类型的不同，运行相应组织的处理程序，具体程序例参考表 7-5:

| 组织类型 | 程序名称 | 运行次数 |
|------------|----------------|------|
| 成年小鼠脾脏、淋巴结 | Mouse_Spleen_2 | 1 次 |
| 成年小鼠肺脏 | Mouse_Lung_2 | 1 次 |
| 成年小鼠肝脏 | Mouse_Liver_2 | 1 次 |
| 成年小鼠肾脏、睾丸 | Mouse_kidney_2 | 1 次 |
| 成年小鼠心脏 | Mouse_Heart_2 | 1 次 |

表 7-5

- 10) 用 1 mL RPMI 1640 或 DMEM 润湿 70 μm （注：肾脏组织用 40 μm ）细胞滤器，用润湿后的 40 μm 或 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；
- 11) 用 9 mL RPMI 1640 或 DMEM 冲洗组织处理管，并滤过 40 μm 或 70 μm 滤器，收集于步骤 10 中的 50 mL 离心管中（如细胞数量较少时，可换成 15ml 离心管进行离心）；
- 12) 将细胞悬液进行离心，根据处理的组织类型的不同，运行相应的离心程序，具体程序例参考表 7-6，彻底弃去上清；

| 组织类型 | 离心速度 | 离心时间 |
|------------|-------|--------|
| 成年小鼠脾脏、淋巴结 | 300×g | 10 min |
| 成年小鼠肺脏 | 600×g | 6 min |
| 成年小鼠肝脏 | 300×g | 10 min |
| 成年小鼠肾脏、睾丸 | 300×g | 5 min |
| 成年小鼠心脏 | 600×g | 5 min |
| 新生大小鼠心脏 | 600×g | 5 min |

表 7-6

- 13) 根据处理的组织类型的不同，可能会对获得的单细胞进行碎片去除处理（如：肝、心（成年小鼠））或红细胞去除（如：脾、肺、肝、心、肾），睾丸、淋巴结不需要裂红处理；

可选) 如要进行去碎片处理, 用瑞沃德碎片高效去除试剂盒 (瑞沃德#DHDR-5006) 处理:

- a) 处理肝脏用 6200 μL 冷的 PBS 重悬混匀步骤 12 中得到的细胞沉淀 (不能振荡重悬), 并转移到 15 mL 离心管中, 向该离心管中加入 1800 μL 冷的碎片去除试剂, 然后进行步骤 c;
- b) 处理心脏用 3100 μL 冷的 PBS 重悬混匀步骤 12 中得到的细胞沉淀 (不能振荡重悬), 并转移到 15 mL 离心管中, 向该离心管中加入 900 μL 冷的碎片去除试剂, 然后进行步骤 c;
- c) 用 1mL 移液枪轻轻吹打 10 次混匀, 然后沿 15 mL 离心管管壁慢慢滴加 4 mL 冷的 PBS, 将细胞悬液 3000 $\times g$, 4°C, 升速为 5, 降速为 3 进行离心 10 分钟, 离心后溶液出现分层, 表现为 3 层, 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, 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, 彻底弃去上清。

可选) 用红细胞裂解液 (索莱宝: #R1010) 2 mL 对步骤 13 处理后的细胞进行重悬, 然后放置冰上孵育 3 ~ 5 min, 接着用 9 mL 的 RPMI 1640 或 DMEM 终止, 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。

8 注意事项

- 1) 本试剂盒有效期为 6 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) 酶试剂分装保存, 避免反复冻融, 且使用时为保持酶活性需要在冰上或 4°C 冰箱溶解后使用。

*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