

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℃ 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

- 2) 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的质量的组织块；
- 3) 将相应组织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 的套管中（注意：确保样本材料位于转子/定子所在的区域）；
- 5) 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

- 6) 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，在恒温震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	震荡速度	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