

小鼠肠道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
小鼠肠道组织温和酶解试剂盒	DHIE-5007	50 T

产品描述

本产品可以将小鼠（6~10 Weeks）肠道（指小肠）组织温和、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悬液，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可继续用于细胞分选、原代细胞培养、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，将肠道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，而小鼠肠道组织温和酶解试剂盒主要是通过酶消化组织，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
小鼠肠道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℃
	Buffer D（溶液）	1 瓶	-25~-15℃
	Buffer E（溶液）	1 瓶	-25~-15℃
	Buffer H（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	样本起始量
小鼠肠道（小肠）组织	50 T	每次处理 200~600 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 <sup>2+</sup> 和 Mg <sup>2+</sup> ）	HBSS 缓冲液（不含 Ca <sup>2+</sup> 和 Mg <sup>2+</sup> ）	红细胞裂解液（可选）
	FBS 胎牛血清	PBS 缓冲液	RPMI 1640 或 DMEM 培养基

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 5.5 mL HBSS 缓冲液（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 1.4 mL 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 1.4 mL 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。
- Buffer D，Buffer E 直接分装至-25~-15℃保存，避免使用时反复冻融，Buffer H 置于 2~8℃存储即可。

- 清洗液配制：


配制体积	配制过程	调 PH
20 mL	17.8 mL HBSS（不含 Ca <sup>2+</sup> 和 Mg <sup>2+</sup> ）+ 1 mL FBS 胎牛血清 + 20 μL Buffer D + 1 mL Buffer E + 200 μL Buffer H	加 25 μL 4M NaOH，调至 7.2~7.4

- 酶混合液配制：


按照下表配制酶混合液于组织处理管中，该酶混合液现配现用。该酶混合液能处理 200~600 mg 的肠道组织。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 2.5 mL。

样本范围	酶混合液			
200~600 mg	2.12 mL HBSS 缓冲液（含 Ca <sup>2+</sup> 和 Mg <sup>2+</sup> ）+ 20 μL Buffer H + 210 μL FBS	酶 A 100 μL	酶 B 25 μL	酶 C 25 μL

自动化酶解方案

- 取 6~10 周龄小鼠的肠道（主要取小肠部分），将其置于含有冷的 PBS 缓冲液的培养皿中。
- 用手术器械去除多余的脂肪、淋巴组织以及血丝，然后纵向切开肠道组织，清除粪便杂质，用冷的 PBS 缓冲液清洗 3~5 遍，直至清洗后没有明显杂质即可，用手术器械将肠道表面的水分捋干，然后横向将肠道切成大约 2~4 mm 长的小碎片。  
 注意：组织需尽可能剪短，如组织块太长，可能会卡在组织处理管内，造成组织残留。
- 根据组织样本范围称量组织，将组织块转移到含有 20 mL PBS 缓冲液的 50 mL 离心管中，再将 50 mL 离心管放在 1000~1500 RPM 涡旋振荡器上震荡清洗 30 s（尽可能使组织充分晃动），用 100 μm 的细胞滤器过滤弃掉 PBS 缓冲液。
- 将细胞滤器上的组织块转移到含有 20 mL 清洗液的 50 mL 离心管中，在 37℃ 150 RPM 恒温振荡

水浴锅中清洗样本组织 30 min，离心管倾斜放置，使得离心管内组织块充分晃动。


 注意：如没有恒温振荡水浴锅，可使用 37℃恒温摇床替代。

(5) 清洗结束后，用 100 μm 细胞滤器过滤组织样本，将细胞滤器上的组织块收集到含有 20 mL PBS 缓冲液的 50 mL 离心管中，上下颠倒清洗 10 次（尽可能使组织充分晃动），再次过 100 μm 细胞滤器过滤弃掉 PBS 缓冲液。

(6) 重复步骤（5）一次。

(7) 将细胞滤器上的组织转移至含有酶混合液的组织处理管中，拧紧组织处理管，轻轻摇晃混匀。

(8) 将管子倒置安装到单细胞悬液制备仪套管中，并安装加热套。

 注意：确保样本材料位于转子/定子所在的区域。

(9) 运行程序 M\_Intestine\_Heater\_1。

(10) 程序运行结束后，从单细胞悬液制备仪上取下组织处理管，用 1 mL RPMI 1640 或 DMEM 培养基润洗 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。

(11) 用 10 mL RPMI 1640 或 DMEM 培养基清洗组织处理管，并滤过 100 μm 细胞滤器，收集于步骤（10）的 50 mL 离心管中。

 注意：使用 40 μm 细胞滤器再次过滤细胞悬液。

(12) 室温下 300× g 离心 10 min，离心结束后，彻底弃掉上清。

(13) 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。

### 手工酶解方案


(1) 根据“*自动化酶解方案*”步骤（1）~（6）的方法进行实验，将预处理后的组织加入到含有酶混合液的 50 mL 离心管中，拧紧盖子，放入 37℃ 50 RPM 的恒温振荡水浴锅中，孵育 30 min。

 注意：手工操作方案中可以用 50 mL 离心管代替组织处理管。

(2) 孵育结束后，从水浴锅中取出组织处理管或离心管，加入 3 mL RPMI 1640 或 DMEM 培养基终止消化，再使用 1 mL 移液枪轻轻吹打，至到无明显组织块（吹打时将枪头尖端剪掉 0.5 cm 左右）。

(3) 用 1 mL RPMI 1640 或 DMEM 培养基润洗 100 μm 细胞滤器，用润湿后的 100 μm 细胞滤器过滤细胞悬液，再用 100 mL RPMI 1640 或 DMEM 培养基清洗组织处理管或离心管并滤过 100 μm 滤器，50 mL 离心管收集细胞悬液。

(4) 参考“*自动化酶解方案*”步骤（12）~（13）进行后续的操作。

 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) “*自动化酶解方案*”的步骤（5）、（6）对实验结果影响较大，此操作不可省略。

(4) Buffer D 具有低毒性，使用过程中要戴好手套避免接触到皮肤，如接触到皮肤需尽快用清水或肥皂水反复冲洗。

(5) 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，该试剂可接受 37℃放置 2 天。

\*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