

小鼠皮肤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
小鼠皮肤组织温和酶解试剂盒	DHWSE-2509	25 T

产品描述

本产品可以将小鼠（6~10 Weeks）背部或耳朵皮肤组织温和、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、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，将皮肤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，而小鼠皮肤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
小鼠皮肤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	2~8℃
	碎片高效去除试剂（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
小鼠背部或耳朵皮肤组织	25 T	每次处理 20~500 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⁺ ）	RPMI 1640 或 DMEM 培养基	PBS 缓冲液
耗材	组织处理管（瑞沃德）	加热套（瑞沃德：# HJ-400）	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）	高速台式冷冻离心机 (瑞沃德：# M1416R)	恒温水浴锅
------	---------------	-----------------------------	-------

实验操作

试剂准备

- 配制酶 A 溶液：用 2.7 mL 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（可以 37℃孵育 3~5 min 帮助溶解），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 2.7 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。

- 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 20 mg~500 mg 的皮肤组织。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 mL。

样本类型	样本范围	酶混合液
背部皮肤	100~500 mg	Buffer D 1.75 mL+ 酶 A 100 μL+ 酶 B 50 μL+ 酶 C 100 μL
耳朵皮肤	20~300 mg	

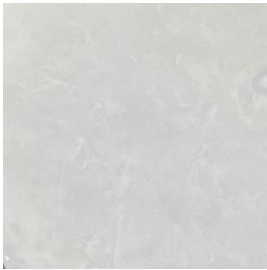
⚠ 注意：酶 A 溶液需在 37℃水浴锅中充分溶解后再使用。

自动化酶解方案

- 取 6~10 周龄的小鼠，实施颈椎脱位安乐死后先用脱毛仪进行背部皮肤脱毛处理，再使用脱毛膏涂抹在小鼠背部皮肤上，静置 3~5 min 即可擦去脱毛膏，剪下已脱毛的皮肤组织，放置在冷的 PBS 缓冲液中。
- 背部皮肤：轻轻地将皮肤腹膜和背部肌肉分离，用镊子保持皮肤样本不动，同时用手术剪刀或手术刀的闭合圆边尖端分离皮肤样本，反复用冷的 PBS 缓冲液清洗 3 遍，直至清洗后没有杂质即可（可观察皮肤内颜色由淡黄色变为白色，说明处理较干净），然后将皮肤切成大约 2~4 mm 左右长的小碎片。

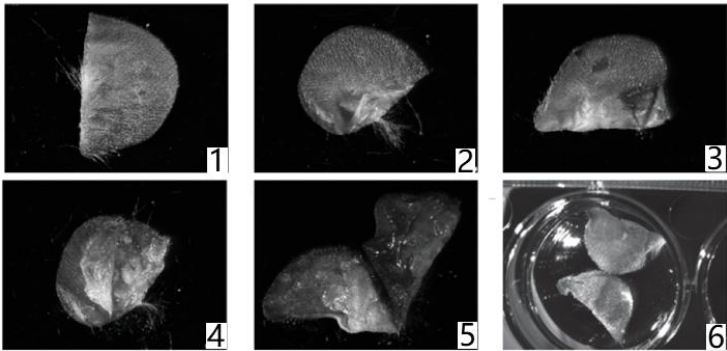


（背部皮肤组织处理前）



（背部皮肤组织处理后）

耳朵皮肤：把老鼠耳朵上无毛的部分剪掉，用镊子将背侧和腹侧分开，用镊子轻轻刮耳朵内侧，去除任何残留的软骨，然后再剪成 2~4 mm 左右长的小碎片。



- (3) 根据样本范围称量组织，将组织块转移到含有酶混合液的组织处理管中，拧紧组织处理管，两者轻轻混匀。
- ⚠ 注意：确保样本位于转子/定子所在的区域。
- (4) 将管子倒置安装到单细胞悬液制备仪的套管中，装上加热套，并运行程序 M_Skin_Heater_1。
- (5) 运行程序结束后，在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 40 μ m 细胞滤器，用润湿后的 40 μ m 细胞滤器过滤细胞悬液，50 mL 离心管收集细胞悬液。
- (6) 再用 10 mL RPMI 1640 或 DMEM 培养基清洗组织处理管，并滤过 40 μ m 滤器，收集于步骤（5）中的 50 mL 离心管中，将 50 mL 离心管内的细胞悬液转移至 15 mL 离心管。
- (7) 室温下 500 \times g 细胞悬液离心 8 min，彻底弃掉上清液。
- (8) 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：如获得的单细胞悬液中仍然有絮状物，可再过一次 40 μ m 细胞滤器。
- (可选) 如要去除细胞悬液中的絮状物，使用试剂盒内的碎片高效去碎片试剂可去除絮状物。

组织重量	PBS 重悬细胞体积	碎片高效去除试剂体积	上层 PBS 体积	适用管子
200 mg~500 mg	1.55 mL	450 μ L	2 mL	15 mL 离心管

- ⚠ 注意：样本重量在 200 mg 以下无需进行絮状物处理。
- ① 根据上表使用 1.55 mL 预冷的 PBS 缓冲液重悬细胞沉淀，加入 450 μ L 碎片高效去碎片试剂，并用 1 mL 移液枪轻轻吹打 5~10 次混匀（絮状物要吹散开），再沿着离心管管壁慢慢滴入 2 mL 预冷的 PBS 缓冲液，拧紧瓶盖。
- ② 将上述步骤①的细胞悬液缓慢放入离心机中，设置离心参数：3000 \times g，4 $^{\circ}$ C，升速为 9，降速为 3 进行离心 10 min，离心结束后取出离心管，使用移液枪彻底弃掉上清液。
- ③ 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：步骤②中放入或取出离心管时尽可能缓慢且保持离心管是垂直状态，避免出现晃动造成絮状物分散开。

手工酶解方案

- (1) 根据自动化酶解方案步骤（1）~（3）的方法进行实验，将含有组织和酶的组织处理管放入 37 $^{\circ}$ C 的水浴锅中，静置孵育 1 h。
- ⚠ 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，用 1 mL RPMI 1640 或 DMEM 培养基润洗 40 μ m 细胞滤器，用润湿后的 40 μ m 细胞滤器过滤细胞悬液，再用 5 mL RPMI 1640 或 DMEM 培养基清洗组织处理管或离心管并滤过 40 μ m 细胞滤器，50 mL 离心管收集细胞悬液。

- (3) 将 40 μ m 细胞滤器转移至 60 mm 的平皿中，加入 3 mL RPMI 1640 或 DMEM 培养基浸没组织，使用注射器活塞(末端)轻轻研磨组织 30 s，可看到细胞流出，液体颜色变浑浊，将皿内溶液滤过 40 μ m 细胞滤器。
- (4) 再用 5 mL RPMI 1640 或 DMEM 培养基清洗 60 mm 的平皿，并滤过 40 μ m 滤器，收集于步骤（2）中的 50 mL 离心管中，将 50 mL 离心管内的细胞悬液转移至 15 mL 离心管。
- (5) 室温下 500 \times g 细胞悬液离心 8 min，彻底弃掉上清液。
- (6) 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：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) 在组织预处理上，尽可能去除皮肤中多余的脂肪与肌肉组织，减少杂质对后续实验的影响。
- (4) 实验小鼠周龄最好控制在 6~10 Weeks，超过 10 周龄的实验效果有所差异。
- *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