

大小鼠成年脑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
大小鼠成年脑组织温和酶解试剂盒	DHABE-5003	50 T

2 产品描述

大小鼠成年脑组织温和酶解试剂盒可以将大小鼠成年脑组织、海马组织、皮层组织和脊髓组织（大小鼠周龄 P>7，主要集中在 P9 ~ 12 Week）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原代细胞培养或细胞分选等下游实验应用。

**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，将大小鼠成年脑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，而大小鼠成年脑组织温和解离试剂盒则主要是通过酶解作用消化组织。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 6 瓶试剂，包括：
- 1 瓶酶 A 试剂（干粉）
  - 1 瓶酶 B 试剂（干粉）
  - 1 瓶碎片高效去除试剂（溶液）
  - 2 瓶 Buffer A 缓冲液
  - 1 瓶 Buffer B 缓冲液

4 测试容量

可以进行 50 次大小鼠成年脑组织、海马组织、皮层组织和脊髓组织解离，每次处理 20 ~ 500 mg 大小鼠成年脑组织，20 ~ 300 mg 的海马组织，20 ~ 300 mg 的皮层组织，20 ~ 300 mg 的脊髓组织。

5 运输和保存

- 2 ~ 8℃运输；
- 试剂盒里面的一种酶组分酶 B 置于-25 ~ -15℃存储，其它组份置于 2 ~ 8℃存储，有效期 12 个月。

6 试剂与仪器要求

- PBS 缓冲液
- RPMI 1640
- DMEM 培养基
- HBSS 缓冲液（含 Ca<sup>2+</sup>和 Mg<sup>2+</sup>）

- 碎片高效去除试剂盒（瑞沃德：# DHDR-5006）
- 红细胞裂解液（可选）
- 恒温振荡水浴锅
- 70 μm 细胞滤器
- 组织处理管\*（瑞沃德）
- 加热套（瑞沃德：# HJ-400）
- 单细胞悬液制备仪（瑞沃德）
- 0.22 μm 针头过滤器（可选）

7 使用方法

7.1 酶试剂准备

7.1.1 酶干粉溶解配制

- (1) 配制酶 A 溶液：用 5.5 mL HBSS 缓冲液（含  $\text{Ca}^{2+}$ 和  $\text{Mg}^{2+}$ ）溶解酶 A 试剂瓶中的粉末，溶解后直接分装-25~-15℃保存(可以 37℃孵育 3~5min 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；
- (2) 配制酶 B 溶液：用 2.75 mL Buffer B 溶解酶 B 试剂瓶中的粉末，溶解后直接分装-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。

7.1.2 酶混合液配制

按照下表配制酶 mix 1，该酶混合液现配现用。该酶 mix 1 能处理 20~500 mg 的成年脑组织，20~300 mg 的海马组织、皮层组织和脊髓组织。如果处理的成年脑组织的重量大于 500 mg，则根据脑组织重量相应的同比例加大酶 mix 1 的体积用量。每个组织处理管最大能处理 1000 mg 的大小鼠成年脑组织和 300 mg 的海马组织、皮层组织和脊髓组织。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。

酶 mix 1		
酶 A 100 μL	Buffer A 1850 μL	酶 B 50 μL

 注意：酶 A 试剂储存液需要在 37℃水浴孵育 3~5 min 后完全溶解后配制成酶 mix 1。


7.1.3 酶试剂活化

将配制好酶 mix1 的组织处管理放置在 37℃水浴锅 50~100 rpm 振荡孵育 25~30 min。

7.2 成年脑组织温和酶解方案

- (1) 获取成年脑组织、海马组织（一只鼠有两片海马组织）、皮层组织或脊髓组织后样本后需要将其放进盛有 PBS 缓冲液或 RPMI 1640 或 DMEM 培养基的培养皿中暂存，溶液须没过组织，用眼科小弯镊轻轻地将上述组织表面的血丝尽可能去除。
- (2) 对组织样本进行相应处理（全脑组织需要用剪刀剪成 4 小块左右，一片海马组织剪成 2 半、一个皮层组织剪成 4 小块、脊髓组织剪成 0.5 cm 长度的小段）。
- (3) 称量相应组织的重量，将相应组织块转移到 7.1.3 步骤中孵育酶 mix 1 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。

(5) 成年脑组织、皮层组织和脊髓组织运行程序 M\_ABrain\_Heater\_2，海马组织运行程序 M\_ABrain\_Heater\_1。

(6) 程序运行结束后，从单细胞悬液制备仪上取下组织处理管，倒转管子，放入离心机上瞬时用 7 s 或者 300 g 离心 15 s，使样本组织沉到组织处理管底部，用 1 mL 的移液枪，吹打混匀细胞悬液 10~15 次。

(7) 用 1 mL PBS 缓冲液或 RPMI 1640 或 DMEM 培养基润湿 70  $\mu$ m 细胞滤器，用润湿后的 70  $\mu$ m 细胞滤器过滤细胞悬液样本，50 mL 离心管收集细胞悬液。

(8) 用 5 mL PBS 缓冲液或 RPMI 1640 或 DMEM 培养基冲洗组织处理管，并滤过 70  $\mu$ m 滤器，收集于步骤 (7) 中的 50 mL 离心管中。

(9) 将细胞悬液 300 $\times$ g 离心 10 min，彻底弃去上清。

(10) 去碎片处理


(a) 用于处理重量范围为：20 mg~1000 mg，参考下表进行去碎片处理：

组织重量	PBS 缓冲液重悬细胞的终体积	碎片高效去除试剂体积	上层 PBS 缓冲液体积	适用管子
20~100 mg	1550 $\mu$ L	450 $\mu$ L	2 mL	15mL 离心管
101~500 mg	3100 $\mu$ L	900 $\mu$ L	4 mL	15 mL 离心管
501~1000 mg	6200 $\mu$ L	1800 $\mu$ L	4 mL	15 mL 离心管

(b) 步骤 (9) 中得到的细胞沉淀尽可能吸掉上清，不能振荡重悬，根据组织重量范围添加对应的 PBS 缓冲液重悬细胞至表格中对应体积，并加入相应体积的碎片高效去除试剂（用 1 mL 移液枪轻轻吹打 10 次与细胞悬液混匀）和上层 PBS 缓冲液体积（沿离心管管壁慢慢滴加提前预冷的 PBS）。

(c) 然后，将细胞悬液 3000 $\times$ g，4 $^{\circ}$ C，升速为 9，降速为 3 进行离心 10 min（不同品牌的离心机的升降速可适当调节），离心后溶液出现分层，分为 3 层溶液，彻底弃去上清液，收集下层细胞。

(11) 红细胞去除，采用 1 $\times$ 红细胞裂解液 1~2 mL 对步骤 (10) 处理后的细胞进行重悬，然后放置冰上孵育 2~3 min，接着用 9 mL 的 PBS 缓冲液或 RPMI 1640 或 DMEM 培养基重悬，将细胞悬液 300 $\times$ g 离心 10 min，彻底弃去上清。

 **注意：**如果不需要进行红细胞处理，则用 10ml 的 PBS 缓冲液或 RPMI 1640 或 DMEM 培养基对步骤 (10) 处理后的细胞进行重悬，将细胞悬液 300 $\times$ g 离心 10 min，彻底弃去上清。

(12) 用 PBS 缓冲液或其它培养基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 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) 每个组织处理管最大能处理 500 mg 的大小鼠成年脑组织和 300 mg 的海马组织、皮层组织和脊髓组织，且当单个组织处理管处理大于 500 mg 的脑组织单位重量的脑组织获得的细胞数量会降低。
- (4) 去碎片离心步骤中，升降速推荐为升 9 降 3 主要适用于艾本德和赛默飞离心机，其它品牌离心机可以参考这个升降速做预实验，确定更合适的升降速。
- (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，该试剂盒已进行了运输测试。

\*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