

小鼠肠道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
小鼠肠道组织温和酶解试剂盒	DHIE-5007	50 T

2 产品描述

小鼠肠道组织温和酶解试剂盒可以将小鼠（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样本，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，将小鼠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 8 瓶试剂，包括：

- 1 瓶酶 A（干粉）
- 1 瓶酶 B（干粉）
- 1 瓶酶 C（干粉）
- 1 瓶 Buffer B 缓冲液
- 1 瓶 Buffer C 缓冲液
- 1 瓶 Buffer D 缓冲液
- 1 瓶 Buffer E 缓冲液
- 1 瓶 Buffer H 缓冲液

4 测试容量

可以进行 50 次小鼠肠道（小肠）组织解离，每次可处理 200 mg ~ 600 mg 肠道组织。

5 运输和保存

2 ~ 8°C 运输；

酶 C 干粉、Buffer D、Buffer E 组份在 -25 ~ -15°C 存储，酶 A 干粉、酶 B 干粉、Buffer B、Buffer C、Buffer H 组份在 2 ~ 8°C 存储，有效期 12 个月。

6 试剂与仪器要求

- PBS 缓冲液
- FBS 胎牛血清
- RPMI 1640 或 DMEM 培养基
- HBSS 缓冲液（含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} ）

- HBSS 缓冲液（不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} ）
- 红细胞裂解液（可选）
- 恒温振荡水浴锅
- 100 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 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} ）溶解酶 A 试剂瓶中的粉末，溶解后直接分装至-25 ~ -15 $^{\circ}\text{C}$ 保存，避免反复冻融和剧烈振荡，该酶溶液在-25 ~ -15 $^{\circ}\text{C}$ 条件下可稳定保存 6 个月。
- (2) 配制酶 B 溶液：用 1.4mL Buffer B 溶解酶 B 试剂瓶中的粉末，溶解后直接分装至-25 ~ -15 $^{\circ}\text{C}$ 保存，避免反复冻融和剧烈振荡，该酶溶液在-25 ~ -15 $^{\circ}\text{C}$ 条件下可稳定保存 6 个月。
- (3) 配制酶 C 溶液：用 1.4mL Buffer C 溶解酶 C 试剂瓶中的粉末，溶解后直接分装至-25 ~ -15 $^{\circ}\text{C}$ 保存，避免反复冻融和剧烈振荡，该酶溶液在-25 ~ -15 $^{\circ}\text{C}$ 条件下可稳定保存 6 个月。
- (4) 同理 Buffer D、Buffer E 溶解后直接分装至-25 ~ -15 $^{\circ}\text{C}$ 保存，避免使用时反复冻融，Buffer H 2 ~ 8 $^{\circ}\text{C}$ 存储即可。

7.1.2 清洗液配制

配制体积	配制过程	调 PH
20 mL	17.8 mL HBSS 缓冲液（不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} ）+ 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

7.1.3 酶混合溶液


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 mg ~ 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 2.5mL。

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

7.2 肠道组织温和酶解方案

- (1) 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。
- (2) 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。

(3) 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 μ m 的细胞滤器过滤弃掉 PBS 缓冲液。

(4) 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 $^{\circ}$ C 150 RPM 恒温振荡水浴锅中清洗样本组织 30 分钟，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 $^{\circ}$ C 恒温摇床替代。

(5) 清洗结束后，用 100 μ m 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 μ m 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 μ m 细胞滤器，用润湿后的 100 μ m 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 μ m 细胞滤器，收集于步骤 10 的 50 mL 离心管中。

(12) 室温下 300 \times g 离心 10 分钟，离心结束后，彻底弃掉上清。

(可选) 如需要进行红细胞裂解，可参照以下推荐的方法：

采用 1 \times 红细胞裂解液 1~2 mL 对步骤 (12) 处理后的细胞进行重悬，然后放置冰上孵育 2 min，接着用 10 mL 的 RPMI 1640 或 DMEM 培养基终止裂红，将细胞悬液 300 \times g 离心 10 min，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。

 注意：如重悬后有絮状物杂质，可使用 40 μ m 细胞滤器再次过滤。

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) 酶解方案的 7.2 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 $^{\circ}$ C 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

RWD Life Science Co., Ltd.