

人脐带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
人脐带组织温和酶解试剂盒	DHUTE-2516	25 T

产品描述

本产品可以将人脐带组织温和、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目的细胞分选、脐带间充质干细胞培养、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，将脐带制备成单细胞悬液。瑞沃德单细胞悬液制备仪主要发挥机械解离作用，而脐带组织酶解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。

产品成分

产品名称	组分名称	数量	储存条件
人脐带组织温和酶解试剂盒	酶 A 试剂（干粉）	1 瓶	2~8°C
	酶 B 试剂（干粉）	1 瓶	2~8°C
	酶 C 试剂（干粉）	1 瓶	-25~-15°C
	酶 D 试剂（干粉）	1 瓶	-25~-15°C
	Buffer H（溶液）	2 瓶	2~8°C
	Buffer C（溶液）	1 瓶	2~8°C
	Buffer D（溶液）	1 瓶	2~8°C

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
人脐带组织	25 T	每次处理 0.5~2.0 g（含）

运输和保存

- ◇ 本产品应当 2~8°C 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
	红细胞裂解液（可选）		
耗材	组织处理管（瑞沃德）	加热套（瑞沃德：# HJ-400）	100 μm 细胞滤器

耗材	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）	涡旋振荡仪	恒温振荡水浴锅

实验操作

试剂准备

- 配制酶 A 溶液：用 8.1 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°C 保存，避免反复冻融和剧烈振荡，该酶溶液在 -25~-15°C 条件下可稳定保存 6 个月（可借助离心管辅助溶解）。
- 配制酶 B 溶液：用 5.4 mL HBSS 缓冲液（含 Ca²⁺和 Mg²⁺）溶解酶 B 试剂瓶中的粉末，溶解后直接分装至 -25~-15°C 保存（需要 37°C 孵育 5 min 左右帮助溶解），避免反复冻融和剧烈振荡，该酶溶液在 -25~-15°C 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°C 保存，避免反复冻融和剧烈振荡，该酶溶液在 -25~-15°C 条件下可稳定保存 6 个月。
- 配制酶 D 溶液：用 2.7 mL Buffer D 溶解酶 D 试剂瓶中的粉末，溶解后直接分装至 -25~-15°C 保存，避免反复冻融和剧烈振荡，该酶溶液在 -25~-15°C 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，现配现用。该酶混合液最多能处理 2.0 g 的脐带组织，如果处理的脐带组织的重量大于 2.0 g，需增加组织处理管的数量，如果需要处理少于 1 g 的脐带组织，可减半酶混合液的用量。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 4 mL。

⚠ 注意：酶 B 试剂储存液需要在 37°C 水浴孵育 5 min 左右完全溶解后再配制成酶混合液。

酶混合液				
Buffer H 3.3 mL	酶 A 300 μL	酶 B 200 μL	酶 C 100 μL	酶 D 100 μL

酶混合液活化：

将配制好酶混合液的组织处理管放置在 37°C 水浴锅 50~100 rpm 振荡孵育 25~30 min。

自动化酶解方案

◇ 新鲜脐带组织的酶解方案

- 获取新鲜的脐带组织或保存液中保存的脐带组织后，可先进行酶混合液的配制和活化工作，在酶混合液活化期间进行组织前处理。
- 完整脐带组织可先剪下两末端组织，剩余组织在预冷的 PBS 缓冲液中反复漂洗几遍，将脐带组织剪成小段后进一步冲洗，尽可能的去除所有残留的血液，利用剪刀直接将脐带组织样本在干净的培养皿中剪成 2~4 mm 的小块，或者利用剪刀、止血钳和镊子等手术器械去除脐带组织中的两条动脉和一条静脉血管，剥离“华通氏胶”或“羊膜”等部分的样本组织，将所需的样本组织剪成 2~4 mm 的小块。
- 称量脐带组织的重量，将相应组织块转移到孵育好酶混合液的组织处理管中。
- 接着冻存脐带组织的酶解方案中的步骤（3）继续操作至结束。

◇ 冻存脐带组织的酶解方案

(1) 脐带组织样本的解冻：组织解冻前可先进行酶混合液的配制和活化工作，在酶混合液活化期间进行组织前处理，将装有组织的冻存管放入 37°C 水浴锅中解冻，化冻后将组织转移至盛有恢复室温的 RPMI 1640 或 DMEM 培养基的 50 mL 离心管中暂存，溶液须尽可能多的没过组织，倒置离心管，浸没 1 min 后过 100 μ m 细胞滤器收集脐带组织块。

⚠ 注意：组织块大小在 3 mm 左右，较大块的组织块可在筛网上剪几刀。

(2) 称量脐带组织的重量，将相应组织块转移到孵育好酶混合液的组织处理管中。

(3) 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，运行 H_Cord_Heater_1。

⚠ 注意：确保样本位于转子/定子所在的区域。

(4) 程序结束后，从单细胞悬液制备仪上取下组织处理管，用离心机瞬时离心 7 s，或者 500 \times g 离心 10 s，使样本组织沉到组织处理管底部。

(5) 用 1 mL RPMI 1640 或 DMEM 培养基润湿 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样本，50 mL 离心管收集细胞悬液。

(6) 用 10 mL DMEM 冲洗组织处理管，并滤过 100 μ m 滤器，收集于步骤 (5) 中的 50 mL 离心管中，为了清晰的观察到细胞沉淀，可将所有细胞悬液转移至 15 mL 离心管中再离心。

(7) 将细胞悬液 500 \times g 离心 10 min，小心的吸出所有上清液，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：1 g 组织获得的细胞总量在 10^5 数量级别，为提高最终细胞浓度可选 500 μ L 以下体积的液体重悬细胞沉淀。

(可选) 红细胞去除

如果需要进行红细胞去除，用 200 μ L 红细胞裂解液对步骤 (7) 的细胞沉淀进行重悬，然后放置冰上孵育 2~3 min，接着用 1 mL 左右的 RPMI 1640 或 DMEM 培养基重悬终止，将细胞悬液 500 \times g 离心 5 min，彻底弃去上清后重悬使用。

手工酶解方案

(1) 获取脐带组织样本后，提前按照 *试剂准备* 中的描述，在 50 mL 离心管中进行酶混合液的配制加活化，按照自动化酶解方案所述进行组织前处理工作，切成 2~4 mm 的小块，加入到含有酶混合液的离心管中。

(2) 在恒温振荡水浴锅中，37°C，50 rpm 进行孵育消化。

(3) 共孵育 3 h 左右，期间需要每隔 40 min 左右取出并在涡旋振荡仪振荡 20 s（转速调至中速），共需要涡旋振荡 4~5 次，消化期间密切观察避免消化过度。

(4) 结束消化后观察若有残留组织较多可在涡旋振荡仪上再次进行振荡，打开离心管，使用 1 mL 的移液器，剪掉约 0.5 cm 的枪头尖端，吹打混匀细胞悬液 20 次。

(5) 接着冻存组织的自动化酶解方案中的步骤 (5) 继续操作至结束，过筛步骤时观察到的残留可用 1 mL 的枪头吸取适量培养基在筛网上适当吹打研磨。

⚠ 注意：手工酶解方案较自动化酶解方案存在一定细胞数量波动与组织消化不完全情况，可根据实验情况适当延长消化时间或增加手工吹打次数。

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) 1 g 脐带获得细胞数量在 10^5 数量级别，单个组织处理管配制 4 mL 酶混合液最多可处理 2 g 脐带，如想处理更多组织获得更多细胞，可增加组织处理管的数量，最后获得的细胞进行合并。

(4) 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@rwlds.com

网址：www.rwlds.com 在线商城：www.rwdmall.com