

## 肺组织解离试剂盒，小鼠(92-01-0126)

### [组分]

13 mL 缓冲液 S (20× 储液)

2 瓶酶 D (冻干粉末)

1 瓶酶 A (冻干粉末)

[规格] 50 次消化。

指定的消化次数适用于按照步骤二中的方案消化一只平均体重为 110-150 毫克的小鼠的肺部材料。

[储存条件] 所有成分到货后，请在 2-8 °C 下保存。在包装盒标签上标明的日期前溶解所有成分。

有关冻干成分复溶和复溶后储存的信息，请参阅步骤一。

### [分选原理]

通过将机械解离与细胞外基质的酶降解相结合，可将肺组织解离成单细胞悬浮液，从而保持组织结构的完整性。使用试剂盒组件对肺组织进行酶解消化，并使用组织解离器进行机械解离步骤。解离后，将样本置于过滤器上，以去除单细胞悬浮液中剩余的较大颗粒。细胞应立即进行处理，以用于下游应用，如细胞分离、细胞培养、细胞或分子分析。

### [背景信息]

小鼠肺解离试剂盒专为温和、快速、高效地生成小鼠肺单细胞悬液而设计。该试剂盒经过优化，可获得高产量的白细胞和内皮细胞，同时保留所有细胞表面表位。可使用磁分选技术分离离体细胞。此外，还可对单细胞悬浮液进行体外表型分布分析，以及其他功能、遗传或蛋白质组学研究。

### [试剂和仪器要求]

- PBS: pH 7.2 的磷酸盐缓冲液。
- PEB 缓冲液： 配制含有 pH 7.2 PBS、0.5% 牛血清白蛋白（BSA）和 2 mM EDTA 的溶液。将缓冲液置于 2-8 °C。始终使用新鲜制备的缓冲液。
- 过滤器（70 μm）
- 试管混匀仪与 37°C 培养箱结合使用
- 组织解离器，自动组织解离器，带有加热模块的组织解离器
- (可选) ART® 1000 REACH™ 移液器吸头

### [步骤]

- ▲ 有关使用组织解离器的详情，请参阅组织解离器说明书。
- ▲ 对于组织解离后的细胞培养实验，所有步骤都应在无菌条件下进行。
- ▲ 一只小鼠的肺部材料在约 2.5 mL 酶混合液中解离。一只小鼠肺的重量为 110-150 毫克（雌性 BALB/c 小鼠，6-7 周大）。

#### 一、试剂准备

1. 制备 1×缓冲液 S，例如，将 1mL 20× 缓冲溶液 S 在无菌条件下加入 19 mL 无菌蒸馏水。保存在 2-8 °C。

▲ 注意：在无菌条件下操作。

2. 用 3 mL 1× 缓冲液 S 复溶每个小瓶中的冻干粉末，制备酶 D。关闭小瓶，等待至少 5 分钟，每分钟翻转一次。准备适当容量的等分样品，以避免反复冻融。对于组织解离后的细胞培养实验，酶 D 应在等分之前进行无菌过滤。将等分溶液储存在 -20 °C 下。该溶液可稳定保存 6 个月。

3. 用 1 mL 1× 缓冲液 S 复溶小瓶中的冻干粉，制备酶 A。不要涡旋。准备适当容量的等分样品，以避免反复冻融。将等分样品保存在 -20 °C 下。本溶液复溶后可稳定保存 6 个月。

## 二、肺解离步骤

1. 在 C 管中加入 2.4 mL 1× 缓冲液 S、100 μL 酶 D 和 15 μL 酶 A，制备酶混合物。

2. （可选）如果需要清除红细胞或循环中的白细胞，建议通过右心室灌注肺部。

3. 将小鼠肺脏解剖成单个肺叶，并在装有 pH 值为 7.2 的 PBS 的培养皿中冲洗肺叶以去除残留血液。

▲ 注意：从肺组织中去除胸腺、心脏、传出和传入血管、气管和结缔组织。

4. 将一只小鼠的肺叶转移到装有混合酶的 C 管中。

▲ 注：将酶注入组织可提高细胞产量。因此，用连接 1 mL 注射器的 25 G 针头缓慢注射酶溶液 1-5 次，使培养皿中的每个肺叶充气。

5. 紧闭 C 管，将其倒扣在组织解离器的套管上。

▲ 注：紧闭 C 管，不要超过第一个阻力。

▲ 注：必须确保样品位于转子/定子区域。

6. 如果使用带加热模块的组织解离器的加热功能，则运行程序 37C\_m\_LDK\_1，然后继续执行步骤 11。

如果使用不带加热功能的组织解离器，则运行程序 m\_lung\_01，然后继续执行步骤 7。

7. 程序结束后，从组织解离器上取下 C 管。

▲ 注：完成此步骤后，肺叶不会完全离解。如果肺叶未完全离解，请重复步骤 6 和 7。

8. 使用试管混匀器在 37 °C 下连续旋转培养样品 30 分钟。

9. 将 C 管倒扣在组织解离器套管上。

▲ 注：必须确保样品材料位于转子/定子区域。

10. 运行程序 m\_lung\_02。

11. 程序结束后，将 C 管从组织解离器中分离出来。

12. (可选) 执行短暂的离心步骤，收集管底的样本材料。

13. 重新悬浮样品，将细胞悬浮液装载到放置在 15 mL 试管上的过滤器 (70 μm) 。

▲ 注：可通过 C 管盖中心的隔膜密封开口移液，从封闭的 C 管中取出离体组织。使用 ART1000 REACH1000 μL 移液器吸头。

14. 用 2.5 mL 1× 缓冲液 S 冲洗过滤器 (70 μm) 。

15. 丢弃过滤器 (70 μm) ，将细胞悬浮液在 300×g 转速下离心 10 分钟。完全去除上清液。

16. 用培养基或适当的缓冲液重悬细胞至进一步应用所需的体积。例如，用 PEB 缓冲液重悬细胞，用于磁性细胞分选或流式细胞仪。

17. 立即处理细胞，以便进一步应用。