

肿瘤解离试剂盒，小鼠(92-01-0136)

[组分]

2 瓶酶 D (冻干粉末)

1 瓶酶 R (冻干粉)

1 瓶酶 A (冻干粉末)

1mL 缓冲液 A

[规格] 50 次消化。

按照第二节中的步骤消化 0.04-1 克的肿瘤时，指定的消化次数有效。

[储存条件] 所有试剂到货后立即保存在 2-8 °C 下。在试剂盒标签上标明的日期之前溶解所有成分。

有关冻干成分溶解和溶解后储存的信息，请参阅第一节。

[原理]

通过将机械解离与酶解细胞外基质相结合，可将肿瘤组织解离成单细胞悬浮液，从而保持组织结构的完整性。

使用试剂盒组件对肿瘤组织进行酶解，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]

小鼠肿瘤解离试剂盒是专为从植入或诱导的小鼠肿瘤组织中温和、快速、有效地生成单细胞悬浮液而开发的。该试剂盒经过优化，可获得高产量的肿瘤细胞、基质细胞和肿瘤浸润淋巴细胞（TIL），同时保留细胞表面表位。解离的细胞随后可使用磁分选技术进行分离。此外，还可以分析单细胞悬液的表型分布，并进行其他功能、遗传或蛋白质组研究。

[试剂和仪器要求]

- RPMI 1640 或 DMEM。
- 滤网（70 μm ）。
- 样品混悬仪与 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱结合使用。
- 组织解离器、全自动组织解离器或全自动可加热式组织解离器。
- C 管
- 可选) 红细胞裂解液。
- 可选) 死细胞去除试剂盒
- 可选) 碎片去除试剂盒
- 可选) 组织保存液

[步骤]

- ▲ 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。
- ▲ 用大约 2.5 mL 酶混合液解离 0.04-1g 的肿瘤组织。
- ▲ 使用样品混悬仪缓慢、持续旋转。

一、试剂准备

1. 向每瓶中加入 3 mL RPMI 1640 或 DMEM 复溶冻干粉末，制备酶 D。准备适当容量的等分样品，以避免重复冻融。将等分样品保存在 -20 °C。复溶后的溶液可稳定保存 6 个月。对于组织解离后的细胞培养实验，应在等分前对酶 D 进行无菌过滤。

2. 用 2.7 mL RPMI 1640 或 DMEM 复溶小瓶中的冻干粉，制备酶 R。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。本溶液复溶后可稳定保存 6 个月。

▲ 注意：在提取所需的反应体积之前，请务必立即彻底混合此悬浮液！

3. 将小瓶中的冻干粉末与试剂盒中提供的 1 mL 缓冲液 A 复溶，制备酶 A。切勿涡旋。准备适当体积的等分样品，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、组织解离步骤

▲ 根据肿瘤组织的组织学成分，肿瘤组织可分为软组织、中等组织和硬组织。有关小鼠肿瘤类型的一些示例，请参阅下表。

肿瘤类型	肿瘤样本
软组织、中等组织	黑色素瘤（由 B16 细胞系诱导）或结肠（由 CT26 细胞系诱导）
硬组织	乳腺癌（由 4T1 细胞系诱导）或肺癌（由 TC1 细胞系诱导）

1. 在 C 管中加入 2.35 mL RPMI 1640 或 DMEM、100 μL 酶 D、50 μL 酶 R 和 12.5 μL 酶 A，制备酶混合物。

▲ 注：分析肿瘤浸润白细胞（TILs）时，建议将酶混合物中酶 R 的含量降至 20%（例如，加入 10 μ L 酶 R）。减少酶 R 的含量有助于保留细胞表面表位，但可能导致细胞产量和内皮细胞、上皮细胞及肿瘤相关成纤维细胞（TAFs）的存活率降低。

2. 去除肿瘤样本中的脂肪、纤维和坏死区域。
3. 将肿瘤切成 2-4 毫米的小块。
4. 将组织转移到装有混合酶的 C 管中。
5. 拧紧 C 管，并将其倒扣在组织解离器的套筒上。

▲ 注意：必须确保样品材料位于转子/定子区域内。

全自动可加热式组织解离器解离

1. 根据下表选择一个合适的组织解离程序。

肿瘤类型	解离程序
软组织、中等组织	37C_m_TDK_1
硬组织	37C_m_TDK_2

2. 运行所选程序并继续执行“组织解离器或全自动组织解离器解离”中的第 6 步。

组织解离器或全自动组织解离器解离

1. 运行解离器程序 m_impTumor_02，开始解离软肿瘤、中等肿瘤或硬肿瘤。
2. 程序结束后，将 C 管从组织解离器中取出。
3. 使用样品混悬仪，在 37 $^{\circ}$ C 温度下连续旋转孵育 40 分钟。
4. 将 C 管倒扣在组织解离器的套筒上。

▲ 注意：必须确保样品材料位于转子/定子区域。

5. 根据下表运行下一个解离程序。

肿瘤类型	解离程序
软组织、中等组织	1× m_impTumor_03
硬组织	2× m_impTumor_03

6. 程序结束后，将 C 管从组织解离器中取出。

▲ 注意：处理坚硬的肿瘤时，可能会残留一些较大的组织块。为进一步提高细胞产量，可让剩余组织沉淀，并将上清液转移到新的管中。在装有剩余组织碎片的 C 管中加入 4 mL RPMI 1640 或 DMEM。将管插入组织解离器的套筒中。运行 m_impTumor_01 程序。将得到的细胞悬浮液与之前移除的上清液混合。

7. 可选) 进行短暂的离心步骤，收集管底部的样本材料。

8. 重悬样品并将细胞悬浮液转移到放置在 15 mL 离心管上的滤网 (30 μ m 或 70 μ m) 上。

▲ 注意：可通过 C 管盖中央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 μ L 移液器吸头。

9. 用 10 mL RPMI 1640 或 DMEM 冲洗细胞滤网 (30 μ m 或 70 μ m) 。

10. 将细胞悬浮液在 300 \times g 转速下离心 7 分钟。完全吸取上清液。

11. (可选) 如果样品解离后出现 "粘稠" 现象 (DNA 被释放)，则进行 DNase 处理：将细胞悬浮液 300 \times g 离心 5 分钟，完全吸去上清液，将颗粒重悬于 5 mL RPMI 1640 或 DMEM 中。加入 200

U/mL DNase, 室温孵育 5 分钟。用 5 mL 含血清的缓冲液洗涤 300×g 5 分钟。完全去除上清液,

在 RPMI 1640 或 DMEM 中重悬。

12. 根据需要重悬细胞, 以便进一步应用。

13. (可选) 使用红细胞裂解液或死细胞去除试剂盒去除红细胞或死细胞。

14. (可选) 如有过多碎屑, 使用碎片去除试剂盒。