

肿瘤解离试剂盒，人(92-01-0127)

[组分]

2 瓶 H 酶(冻干粉)

1 瓶 R 酶(冻干粉)

1 瓶 A 酶(冻干粉)

1mL 缓冲液 A

[规格] 25 次消化。

指定的消化次数适用于按照步骤二中的方案消化 0.01-1 克范围内的肿瘤。

[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。

[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]

人体肿瘤解离试剂盒是专为温和、快速、有效地从原发性人体肿瘤组织或异种移植物中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培养或分离。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
- 过滤器（70 μm ）
- 样品混悬仪与 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
- C 管
- 可选）红细胞裂解液
- 可选）组织储存液
- 可选）碎片清除液
- 可选）死细胞清除试剂盒
- 可选）ART[®] 1000 REACH[™] 移液器吸头
- 可选）肿瘤 MACS 培养基，如胰腺肿瘤 MACS 培养基

[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。
- ▲ 用 2.5 mL 混合酶解离 0.05-0.2 g 的肿瘤组织，用 5 mL 混合酶解离 0.2-1.0 g 的肿瘤组织。
- ▲ 样品混悬仪用于缓慢、连续旋转。

一、试剂准备

1. 分别用 3 mL RPMI 1640 或 DMEM 复溶小瓶中的酶 H 冻干粉末。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。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 H 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。准备适当体积的等分样品，以避免反复冻融。将等分样品保存在 -20°C 温度下。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 温度下。本溶液复溶后可稳定保存 6 个月。

二、肿瘤解离步骤

▲ 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。有关人类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	黑色素瘤、卵巢癌、结肠癌、下咽肿瘤或肾肿瘤
中等组织	肺和前列腺肿瘤
硬组织	乳腺、胰腺、肝细胞或头颈部鳞状细胞 (HNSCC) 肿瘤

1. 按照下表在 C 管中加入以下成分，制备酶混合液。

肿瘤样本/活检样本的大小	酶混合液			
0.05-0.2g	2.2 mL RPMI 1640 or DMEM	100 μ L 酶 H	50 μ L 酶 R	12.5 μ L 酶 A
0.2-1.0g	4.7 mL RPMI 1640 or DMEM	200 μ L 酶 H	100 μ L 酶 R	25 μ L 酶 A

▲ 注：分析肿瘤浸润白细胞 (TILs) 时，建议将酶混合物中的酶 R 含量降至 20% (例如，大于 0.2 g 样品时加入 20 μ L 酶 R，小于 0.2g 样品时加入 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、上皮细胞和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。

▲ 注意：在处理小块肿瘤活检样本时，应根据其长度将活检样本切成 2-4 块。

4. 将组织块移入装有混合酶的 C 管中。

5. 拧紧 C 管，并将其倒扣在组织解离器的套管上。

▲ 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	37C_h_TDK_1
中等组织	37C_h_TDK_2
硬组织	37C_h_TDK_3

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 10 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 h_tumor_01，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℃ 温度下连续旋转孵育 30 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	h_tumor_02
中等组织	h_tumor_02
硬组织	h_tumor_01

6. 程序结束后，将 C 管从组织解离器中取出。

7. 使用样品混悬仪在 37 °C 下连续旋转培养样品 30 分钟。

8. 将 C 管倒扣在组织解离器套管上。

▲ 注意：必须确保样品材料位于转子/定子区域内。

9. 根据下表运行下一个组织解离程序 d。

肿瘤类型	解离程序
软组织	h_tumor_03
中等组织	h_tumor_02
硬组织	h_tumor_01

10. 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离心管中。在装有剩余组织块的 C 管中加入 RPMI 1640 或 DMEM（对于 >0.2g 样品，分别加入 4 mL；对于 <0.2g 样品，分别加入 2 mL）。将 C 管插入组织解离器的套管中。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。

11. (可选) 进行短暂的离心步骤，收集离心管底部的样本材料。

12. 重悬样品，并将细胞悬浮液转移至放置在 50 mL 离心管上的过滤器（30 μm 或 70 μm）。

▲ 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 ART 1000 REACH 1000 μL 移液器吸头。

13. 用 20 mL RPMI 1640 或 DMEM 冲洗细胞过滤器（30 μm 或 70 μm）。

14. 将细胞悬浮液在 300×g 转速下离心 7 分钟。完全吸取上清液。

15. (可选) 如果样本在解离后出现 "粘稠" 现象 (DNA 被释放) , 则进行 DNase 处理: 将细胞悬浮液 300×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。完全除去上清液, 用 RPMI 1640 或 DMEM 重悬。
16. 根据进一步应用的需要重悬细胞。
17. (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。
18. (可选) 如果碎片过多, 使用碎片去除液。