

## 肝脏解离试剂盒，小鼠(92-01-0168)

### [组分]

2 瓶酶 D (冻干粉末)

1 瓶酶 R (冻干粉末)

1 瓶酶 A (冻干粉末)

[规格] 25 次消化。

按照第二节中的方案消化重量不超过 1.2 克的肝脏时，指定的消化次数有效。

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

有关冻干成分的复溶和复溶后储存的信息，请参阅第一节。

### [原理]

小鼠肝脏可通过机械解离与酶解细胞外基质相结合的方法解离成单细胞悬浮液，从而保持组织结构的完整性。

使用试剂盒组件对小鼠肝脏进行酶解，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]

小鼠肝脏解离试剂盒是为温和、快速、高效地从小鼠肝脏中生成单细胞悬浮液而开发的。试剂盒经过优化，可获得高产量的非实质性小鼠肝细胞，即肝窦状内皮细胞（LSECs）和 Kupffer 细胞，同时保留大多数细胞表面表位。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浮液的表型分布，并进行其他功能、遗传或蛋白质组研究。

### [试剂和仪器要求]

- 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。
- 含稳定谷氨酰胺的 DMEM。
- 过滤器（100 μm）
- 试管混匀仪与 37°C 培养箱结合使用
- C 管
- 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。
- ▲ 一个小鼠肝脏的重量为 750-1200 毫克（CD1、C57BL/6 或 BALB/c 小鼠，8 周大）。
- ▲ 以大约每分钟 12 转的速度持续运行样品混悬仪。

## 一、试剂准备

1. 用 3 mL 含有稳定谷氨酰胺的 DMEM 复溶瓶中的冻干粉末，制备酶 D。不要试图用移液管或涡流重悬。关闭后倒转小瓶，等待 5-10 分钟以溶解颗粒。准备适当容量的等分样品，避免反复冻融。将等分样品保存在  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  下。溶液复溶后可稳定保存 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 含有稳定谷氨酰胺的 DMEM 复溶瓶中的冻干粉，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  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  下。此溶液在复溶后可稳定保存 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. 用 1 mL 含有稳定谷氨酰胺的 DMEM 复溶小瓶中的冻干粉，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  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  下。本溶液复溶后可稳定保存 6 个月。

## 二、肝脏解离步骤

1. 用移液管将 4.7 mL DMEM 滴入 C 管中，制备解离混合液。加入 200  $\mu\text{L}$  酶 D 溶液、100  $\mu\text{L}$  酶 R 溶液和 20  $\mu\text{L}$  酶 A 溶液。

如果使用带加热器的组织解离器的加热功能，则直接进行步骤 3。

2. 将解离混合液在  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养箱中保持 30 分钟或在水浴中保持 15 分钟。

3. 用 DMEM 冲洗肝脏。

▲ 注意：解剖小鼠肝脏前用镊子取出胆囊。切除结缔组织。

4. 将肝脏转移到装有解离混合物的 C 管中。

5. 紧闭 C 管，将其倒扣在组织解离器的套管上。

▲ 注意：紧闭 C 管，不要超过第一个阻力。

▲ 注意：必须确保样品材料位于转子/定子区域内。

6. 运行解离程序 m\_liver\_03。

如果使用带加热器的自动组织解离器的加热器功能，则运行程序 37C\_m\_LIDK\_1，并继续执行步骤 11。

7. 程序结束后，将 C 管从组织解离器上取下。

8. 使用样品混悬仪在 37 °C 下连续旋转孵育样品 30 分钟。

9. 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。

10. 运行解离程序 m\_liver\_04。

11. 程序结束后，将 C 管从组织解离器中取出。

12. 重新悬浮样品，并将细胞悬浮液转移至筛网上（100 μm）。

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

13. 用含有稳定谷氨酰胺的 5 mL DMEM 冲洗过滤器。

▲ 注意：为了最大限度地回收细胞，在将使用过的 C 管转移到过滤器之前，用洗涤缓冲液冲洗。

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

15. 用 PEB 缓冲液重悬细胞至进一步应用所需的体积。

16. 立即处理细胞，以便进一步应用。