成年脑组织分离试剂盒，小鼠和大鼠(92-01-0172)

[组分]

8 瓶，包含

2.5 mL 酶 P

2×50 mL 缓冲液 Z(无菌)

1.5 mL 缓冲液 Y(无菌)

1 瓶酶 A(冻干粉)

1 mL 缓冲液 A

5 mL 红细胞去除液(10×)(无菌)

45 mL 碎片清除液(无菌)

[规格]50 次消化。

在按照第二节的方案消化 20 毫克至 500 毫克的啮齿动物神经组织时，指定的消化次数是有效的。

[储存条件]酶 P 到货后，立即将等分的酶 P 保存在 -20 °C 下。所有其他成分到货后储存于 2-8 °C。在小瓶标签上标明的日期之前溶解酶 A。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]

成年小鼠或大鼠的神经组织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。

神经组织使用试剂盒组件进行酶解，而机械解离步骤则使用组织解离器。解离后，使用碎片去除溶液去除碎片，然后使用红细胞去除溶液去除红细胞。

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]

成年脑解离试剂盒是为温和、快速、高效地从成年神经组织中生成单细胞悬浮液而开发的，考虑到了来自成年小鼠或大鼠的敏感神经细胞在解离过程中的特殊需要。成年大脑、不同的脑区（如大脑半球、海马体或室管膜下区）或脊髓可用作起始材料。经过优化的解离程序可确保温和的机械解离，并在去除碎片和红细胞后获得高产率的存活细胞。从少量神经组织（20-100 毫克）到较大量神经组织（大于 100 毫克），解离程序、碎片去除方案和红细胞去除方案都有所不同，以确保所有应用都能获得最佳结果。单细胞悬浮液可在体外进行表型分布分析，也可进行其他功能、遗传或蛋白质组研究。此外，解离的细胞随后可使用磁分选技术进行分离或培养。如果要进行后续培养，建议使用至少 800 毫克的神经组织作为解离的起始材料。

[试剂和仪器要求]

- 带加热模块的全自动组织解离器和 C 管
- 含钙、镁、葡萄糖和丙酮酸的 Dulbecco 磷酸盐缓冲液（D-PBS）。保持缓冲液低温（2-8 °C）。
- PB 缓冲液：配制含 D-PBS（pH 7.2）和 0.5% 牛血清白蛋白（BSA）的溶液。保持缓冲液低温（2-8 °C）。使用前对缓冲液进行脱气处理，因为气泡可能会堵塞分选柱。

始终使用新鲜配制的缓冲液。请勿使用 autoMACS 运行缓冲液或 MACSQuant 运行缓冲液，因为它们含有少量叠氮化钠，可能会影响检测结果。

▲ 注意：BSA 可用其他蛋白质代替，如小鼠或大鼠血清白蛋白、小鼠或大鼠血清或胎牛血清（FBS）。

● 筛网（70 µm）

● 双蒸水（ddH_2O）

● 35 毫米直径无菌培养皿

● 15 毫升和 50 毫升离心管

● 吊篮式离心机

● 5 毫升离心管.

● 可选）ART® 1000 REACH™ 移液器吸头用于从封闭的 C 管中去除解离物质。

● 可选）用于后续细胞培养的神经培养基和 NeuroBrew®-21 神经添加剂。

[步骤]

一、试剂准备

▲ 后续培养建议至少离解 800 毫克成体神经组织。

▲ 下面给出的体积是在 1980 µL 酶混液中处理一只成年小鼠大脑（最多 500 毫克）的体积。当处理少于 500 毫克时，请使用与所示相同的体积。处理成年大鼠或不同脑区的神经组织时，应确定重量并相应放大所有试剂体积和总体积。每个 C 管最多可处理 500 毫克神经组织。

▲ 建议使用吊篮式离心机进行离心，如 Thermo Fisher® Scientific 公司的 Heraeus® Multifuge 4KR。

1. 酶 P 已准备就绪。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 ℃ 下。该溶液可稳定保存 6 个月。用 1mL 缓冲液 A 重悬标有酶 A 的小瓶中的冻干粉末。然后将此溶液等分并保存在 -20 ℃ 下，以备后用。避免反复冻融。

2. 根据下表配制酶混合物 1 和酶混合物 2。

酶混合液 1		酶混合液 2	
酶 P 50 μL	缓冲液 Z 1900 μL	缓冲液 Y 20 μL	酶 A 10 μL

二、成年脑组织解离步骤

▲ 有关使用带加热器的全自动组织解离器的详情，请参阅用户手册。

▲ 20 毫克至 500 毫克的啮齿动物神经组织在 2 毫升混合酶中可以在一个 C 管处理 。

▲ 对于组织解离后的细胞培养实验，所有步骤均应在无菌条件下进行。

1. 取出啮齿动物神经组织。用冷 D-PBS 冲洗神经组织。

2. 配制适当体积的酶混合物 1（参见第一节中的表格），并将其转移到 C 管中。

3. 用手术刀将较大的组织（如整个大脑或脊髓）切成约 8 片或 0.5 厘米的矢状切片。如果是较小的组织，如海马体，则直接进行第 4 步。

4. 将组织块转移到装有 1950 μL 混合酶 1 的 C 管中。

5. 将 30 μL 混合酶 2 加入 C 管中。

6. 拧紧 C 管，并将其倒扣在带加热器的自动组织解离器的套管上。

7. 运行相应的解离程序：

20-100 毫克：37C_ABDK_02

>100 mg：37C_ABDK_01。

8. 程序结束后，将 C 管从带加热器的自动组织解离器中取出。

9. 短暂离心，收集离心管底部的样品。

10. 重新悬浮样品并将其转移至放置在 50 mL 离心管上的筛网（70 μm）中。

▲ 注：使用前用缓冲液湿润筛网。

▲ 注意：在增加试剂量和总体积时，也要增加筛网（70 μm）的数量。一个筛网（70 μm）可用于一个成年小鼠大脑。

▲ 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。

▲ 注意：直径大于 70 μm 的细胞可能会丢失。要想获得这些细胞，请使用网眼大小合适的细胞过滤器。

11. 在 C 管中加入 10 mL 冷 D-PBS，拧紧 C 管，轻轻摇动并将 D-PBS 转移至筛网（70 μm）上。

12. 丢弃筛网（70 μm），在 4°C 下以 300×g 离心细胞悬浮液 10 分钟。完全吸出上清液。

13. 继续第三节去除碎片。

三、去除碎片

▲ 下面给出的是细胞悬浮液的体积，起始材料为 20 毫克至最多 1 克神经组织（约 2 只成年小鼠大脑）。当使用更多的组织时，请相应增加所有试剂的体积和总体积。

▲ 最多 1 克神经组织（约 2 只成年小鼠大脑）的细胞悬液可在一个 15 mL 离心管中处理，20-100 毫克的细胞悬液可在一个 5 mL 离心管中处理。

▲ 始终使用预冷的缓冲液和溶液（4 °C）。

	碎片去除液	D-PBS	覆盖（D-PBS）	试剂管
20-100 mg	450 µL	1550 µL	2 mL	5 mL
400-500 mg（~1 个成年脑）	900 µL	3100 µL	4 mL	15 mL
800-1000 mg（~2 个成年脑）	1800 µL	6200 µL	4 mL	15 mL

1. 根据上表，用适当体积的冷 D-PBS 仔细重悬细胞团，然后将细胞悬浮液转移到适当的离心管中。切勿涡旋。

2. 加入适量的冷碎片去除溶液。

3. 充分混合。

4. 根据上表，用适量的冷 D-PBS 轻轻覆盖。

▲ 注意：移液速度要非常缓慢，以确保 D-PBS 相覆盖细胞悬浮液，各相不会混合。

5. 在 4 °C 和 3000×g 转速下离心 10 分钟，全加速，全制动。

▲ 注：如果离心机的离心效果不理想，可降低加速和制动。

6. 形成三相。将顶部的两相完全吸出并丢弃。

7. 注入冷 D-PBS。

8. 轻轻翻转离心管三次。不要涡旋！

9. 在 4 °C 和 1000×g 转速下离心 10 分钟，全力加速，全力制动。完全吸出上清液。

10. 按第四节去除红细胞。

四、红细胞去除

- **准备 1×红细胞去除液**

1. 用双蒸水（ddH_2O）按 1:10 稀释红细胞去除液（10×），例如，用 9 mL 冷 ddH_2O 稀释 1 mL 冷红细胞去除液（10×）。

▲ 注意：不要使用去离子水稀释！

2. 将配制好的 1× 红细胞去除液保存在 2-8 °C。每天结束时丢弃未使用的溶液。

去除红细胞

▲ 下面给出的体积适用于 20 毫克至最多 1 克神经组织（约 2 只成年小鼠大脑）作为起始材料的细胞悬液。当使用更大量的起始材料时，请相应增加所有体积。

1. 将最多两只成年小鼠大脑的细胞团小心重悬于适量的冷 1× 红细胞去除液中：

20-100 mg： 0.5 mL

100-1000 mg： 1 mL。不要涡旋。

2. 在冰箱（2-8 °C）中孵育 10 分钟。

3. 加入适量的冷 PB 缓冲液：

20-100 mg: 5 mL

100-1000 mg： 10 mL。

4. 4 °C 300×g 离心 10 分钟。完全吸取上清液。

5. 用移液管缓慢上下移动，小心地将细胞重悬于适当的缓冲液或培养基中。切勿涡旋。

6. 细胞应立即处理，以便进一步应用。