

多组织解离试剂盒2(92-01-0175)

[组分]

2.5 mL 酶 P

2× 50 mL 缓冲液 X

1.5 mL 缓冲液 Y

1 瓶酶 A(冻干粉)

1 mL 缓冲液 A

1 瓶酶 D(冻干粉)

[规格] 25 次消化。

在 5 毫升混合酶中消化 1 克组织时，指定的消化次数有效。

[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保存在 2-8 °C。在小瓶标签上标明的日期之前溶解酶 A 和 D。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]

不同物种的各种组织，如小鼠肾脏或大鼠肺脏，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。

使用试剂盒组件对组织进行酶解，并使用组织解离仪进行机械解离步骤。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]

多组织解离试剂盒 2 是专为温和、快速、有效地从不同组织中生成单细胞悬浮液而开发的。该试剂盒经过优化，可获得高产率的活细胞。解离的细胞随后可进行培养或分离。此外，还可对单细胞悬浮液进行体外表型分布分析，并进行其他功能、遗传或蛋白质组研究。

[试剂和仪器要求]

- 磷酸盐缓冲液 (PBS) ， pH 值 7.4
- 不含胎牛血清 (FBS) 的细胞培养基，如 RPMI 1640 或 DMEM
- 含 20% FBS 的细胞培养基
- 筛网 (70 μm)
- 组织解离器、自动组织解离器或带加热的组织解离器
- C 管
- PEB 缓冲液： 用 autoMACS 冲洗缓冲液按 1:20 稀释 BSA 储液，制备含有 pH 值为 7.2 的磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 、 0.5% 牛血清白蛋白 (BSA) 和 2 mM EDTA 的溶液。保持缓冲液低温 (2-8 °C) 。始终使用新鲜配制的缓冲液。不要使用 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，可能会影响结果。

▲ 注:EDTA 可由其他补充剂替代,如抗凝柠檬酸葡萄糖配方-A (ACD-A) 或柠檬酸磷酸葡萄糖 (CPD)。

BSA 可以用其他蛋白质代替,例如小鼠或大鼠血清白蛋白、小鼠或大鼠血清或胎牛血清。不建议使用含有 Ca^{2+} 或 Mg^{2+} 的缓冲液或培养基。

● 红细胞裂解液 (10×)

● 碎片清除液

● 吊篮式离心机

● 15 毫升离心管

[步骤]

一、试剂准备

▲ 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。

1. 酶 P 已准备就绪。准备适当体积的等分试剂,避免反复冻融。

将等分样品保存在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下。该溶液可稳定保存 6 个月。

2. 用试剂盒提供的 1mL 缓冲液 A 复溶小瓶中的冻干粉末,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 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下。该溶液可稳定保存 6 个月。

3. 用 3mL 无血清 RPMI 1640 或 DMEM 复溶小瓶中的冻干粉末,制备酶 D。盖上小瓶并等待至少 5 分钟,同时每分钟倒置一次。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 应在等分前进行无菌过滤。

将等分试剂储存在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下。该溶液可稳定保存 6 个月。

二、成年心脏解离步骤

▲ 以下给出的容量为每个 C 管最多 5 个成年小鼠心脏（最多 500 毫克）和 2.5 毫升混合酶。

1. 根据下表准备多组织解离试剂盒 2 的混合酶。

酶混合液 1		酶混合液 2		
酶 P	缓冲液 X	缓冲液 Y	酶 A	酶 D
62.5 μ L	2300 μ L	25 μ L	12.5 μ L	100 μ L

2. 收获成年小鼠的心脏，并将其转移到装有 PBS 的 10 厘米培养皿中。用镊子小心地将剩余的血液抽出心脏。从心室切下血管和剩余的结缔组织。将每颗心脏切成小块（1-2 立方毫米）。

3. 将混合酶 1 在 37 °C 下预热 5 分钟。

▲ 注：如果使用带加热的组织解离器的加热功能，则无需预热。

4. 将 2362.5 μ L 酶混合液 1 加入 137.5 μ L 酶混合液 2。

5. 将收获的组织转移到 C 管中。

▲ 注意：为减少离心管内洗涤培养基的体积，让组织在重力作用下沉淀，并小心去除上清液。

6. 加入 2.5 mL 混合酶，盖紧 C 管。

▲ 注意：关闭 C 管时不要超过第一个阻力。

7. 倒转 C 管，盖子朝下放置。为最大限度地回收细胞，C 管应保持此方向直至步骤 12。

8. (可选) 如果使用组织解离器（带加热器）的加热功能，将 C 管倒扣在组织解离器（带加热器）的套管上。运行程序 37C_Multi_G，然后继续步骤 13。

9. 在 37 °C 下不混合样品孵育 15 分钟。

10. 将 C 管连接到组织解离器的套管上。
11. 运行解离程序 Multi_G。
12. 重复步骤 9-11 两次。
13. 程序结束后，将 C 管从组织解离器中取出，并加入 7.5 mL 含有 20% FBS 的细胞培养基。
14. 重悬样品并将细胞悬浮液转移到放置在合适离心管上的筛网（70 μm ）上。
15. 用 3 mL 含 20% FBS 的细胞培养基清洗筛网（70 μm ）。
16. 丢弃过滤器，将细胞悬浮液在 600 $\times$ g 转速下离心 5 分钟。完全吸出上清液。
17. 继续清除碎片（参阅第三节）。

三、去除碎片

▲ 始终使用预冷的缓冲液和溶液（4 $^{\circ}\text{C}$ ）。

1. 用 6200 μL 冷 PBS 仔细重悬细胞悬液，然后将细胞悬液转移到 15 mL 离心管中。切勿涡旋。
2. 加入 1800 μL 冷的碎片去除溶液。
3. 用 5 mL 移液管上下缓慢移液 10 次，充分混合。
4. 用 4 mL 冷 PBS 缓慢覆盖。

▲ 注意：倾斜离心管并缓慢移液，以确保 PBS 相覆盖细胞悬浮液，各相不会混合。

5. 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 和 3000 $\times$ g 转速下全力加速和全力制动离心 10 分钟。形成三相。
6. 将顶部的两相完全吸出并丢弃。
7. 注入冷 PBS 至最终体积 15 mL。
8. 轻轻倒转离心管三次。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。
10. 完全吸取上清液。
11. 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！
12. 进行红细胞裂解（请参阅第四节）。

四、红细胞裂解

1. 用 1 mL PEB 缓冲液重悬细胞团，并加入 10 mL 1× 红细胞裂解液去除红细胞。
2. 室温（19-25 °C）下孵育最多 2 分钟。
3. 600×g 离心 5 分钟。完全吸取上清液。
4. 在一个新离心管中加入 15 μL 多种组织解离试剂盒 2 的酶 A 至 10 mL PBS。
5. 将细胞颗粒重悬于含酶 A 的 10 mL PBS 中。
6. 600×g 离心 5 分钟。完全吸取上清液。
7. 用适当的缓冲液或培养基重悬细胞至进一步应用所需的体积。