

## 小鼠肠道组织温和酶解试剂盒说明书-正式装

### 1 产品信息

产品名称	产品型号	产品规格
小鼠肠道组织温和酶解试剂盒	DHIE-5007	50 T

### 2 产品描述

小鼠肠道组织温和酶解试剂盒可以将成年小鼠（6~10 Weeks）肠道（指小肠）组织温和、快速、高效地制备成单细胞悬液。这一优化方案能够获得尽可能多、细胞活率高的单细胞样本，同时保留细胞重要的表面抗原表位。制备获得的单细胞悬液可继续用于细胞分选、原代细胞培养等下游实验应用。

**主要原理：**通过机械剪切和酶消化细胞外基质（维持组织结构完整性）相结合的方法，将小鼠肠道组织制备成单细胞悬液。瑞沃德单细胞悬液制备仪主要发挥机械解离作用，而小鼠肠道组织温和酶解试剂盒则主要是通过酶解消化组织。解离后用细胞滤器过滤样本，以去除样本中的组织残渣，从而获得单细胞悬液，获得的细胞可立即用于后续实验，如原代细胞培养、细胞分选、单细胞测序等。

### 3 产品成分

共 8 瓶试剂，包括：

- 1 瓶酶 A（干粉）；
- 1 瓶酶 B（干粉）；
- 1 瓶酶 C（干粉）；
- 1 瓶 Buffer B（溶液）；
- 1 瓶 Buffer C（溶液）；
- 1 瓶 Buffer D（溶液）；
- 1 瓶 Buffer E（溶液）；
- 1 瓶 Buffer H（溶液）。

### 4 测试容量

可进行 50 次小鼠肠道（小肠）组织解离，每次可处理 200 mg ~ 600 mg。

### 5 运输和保存

2~8℃冰袋运输；

酶 C 粉末、Buffer D、Buffer E 组份在-25~-15℃存储，酶 A 粉末、酶 B 粉末、Buffer B、Buffer C、Buffer H 组份在 2~8℃存储，有效期为 12 个月。

### 6 试剂与仪器要求

- 单细胞悬液制备仪 DSC-400（瑞沃德）；
- 加热套（瑞沃德）；
- 组织处理管\*（瑞沃德）；
- 推荐可选）D-Hanks(不含钙镁)（索莱宝：#H1040）；

推荐可选) Hanks(含钙镁) (索莱宝: #H1020);

推荐可选) 红细胞裂解液(索莱宝: #R1010);

恒温振荡水浴锅;

100  $\mu$ m 细胞滤器;

FBS 胎牛血清;

PBS 缓冲液;

PB Buffer (含有 0.5% BSA 的 PBS)。

## 7 使用方法

### 7.1 试剂准备及分装

- 1) 酶 A 粉末使用 5.5 mL Hanks (含钙镁) 充分溶解;
- 2) 酶 B 粉末使用 1.4 mL Buffer B 充分溶解;
- 3) 酶 C 粉末使用 1.4 mL Buffer C 充分溶解。

以上酶试剂均溶解后分装 -25~-15 $^{\circ}$ C 保存, 避免反复冻融和剧烈震荡, 酶溶液在-25~-15 $^{\circ}$ C 条件下可稳定保存 6 个月;

同理 Buffer D、Buffer E 根据每次用量分装冻存, 避免使用时反复冻融, 分装后放置于 -25~-15 $^{\circ}$ C 存储;

其它试剂 2~8 $^{\circ}$ C 存储即可。

### 7.2 清洗液配制方法

配制体积	配制过程	调 PH
20 mL	17.8 mL D-Hanks(不含钙镁) + 1 mL FBS 胎牛血清 + 20 $\mu$ L Buffer D + 1 mL Buffer E + 200 $\mu$ L Buffer H	加 25 $\mu$ L 4M NaOH, 调 至 7.2~7.4

### 7.3 酶解体系配制


在组织处理管中配制相应的酶混合溶液, 如组织分离后的细胞需要进行细胞培养实验, 配制的酶解溶液用 0.22  $\mu$ m 的滤头进行无菌过滤处理, 过滤后保证酶解体系总体积在 2.5 mL。

样本范围	酶混合液	酶 A	酶 B	酶 C
200 mg ~ 600 mg	2.12 mL Hanks(含钙镁) + 20 $\mu$ L BufferH + 210 $\mu$ L FBS	100 $\mu$ L	25 $\mu$ L	25 $\mu$ L

### 7.4 组织温和酶解方案

#### 7.4.1 使用带有 HJ-400 加热套的 DSC-400 单细胞悬液制备仪

- 1) 取 6~10 周龄 ICR 或 C57 小鼠的肠道 (主要取小肠部分), 将其置于含有冷的 PBS 缓冲液的培养皿中;
- 2) 去除多余的脂肪、淋巴组织以及血丝, 纵向切开肠道组织, 清除粪便杂质, 用冷的 PBS 缓冲液涮洗 3~5 遍, 直至清洗后没有明显杂质即可, 用器械将肠道表面的水分捋干, 然后横向将肠道切成大约 0.5~1 厘米长的小碎片;

 注: 组织需尽可能剪短, 如组织块太长, 可能会卡在组织处理管内, 造成组织残留。

- 3) 根据样本范围称量组织，将组织块转移到含有 20 ml PBS 缓冲液的 50 mL 离心管中，再将 50 mL 离心管放在 1000 ~ 1500 RPM 涡旋振荡器上震荡清洗 30 s，用 100  $\mu$ m 的细胞滤器过滤弃掉 PBS；
- 4) 将细胞滤器上的组织块转移到含有 20 mL 清洗液的 50 mL 离心管中，在 37  $^{\circ}$ C 150 RPM 恒温振荡水浴锅中清洗样本组织 30 分钟，离心管倾斜放置，使得离心管内组织块充分晃动；  
**⚠ 注:同时将酶混合液转入组织处理管中，37 $^{\circ}$ C预热 30 分钟。**
- 5) 清洗结束后，用 100  $\mu$ m 细胞滤器过滤组织样本，将细胞滤器上的组织收集到含有 20 mL PBS 缓冲液的 50 mL 离心管中，上下颠倒清洗 10 次，再次过 100  $\mu$ m 细胞滤器过滤弃掉 PBS；
- 6) 重复步骤 5) 一次；
- 7) 将细胞滤器上的组织样本转移至含有酶混合液的组织处理管中；
- 8) 将酶 A 100  $\mu$ L，酶 B 25  $\mu$ L，酶 C 25  $\mu$ L 加入到上述含有组织样本的组织处理管中，拧紧组织处理管，两者轻轻混匀；
- 9) 将管子倒置安装到单细胞悬液制备仪 DSC-400 的套管中，并安装加热套；  
**⚠ 注：确保样本材料位于转子/定子所在的区域。**
- 10) 运行 “M\_Intestine\_Heater\_1” ；
- 11) 程序结束后，在单细胞悬液制备仪上取下组织处理管，用 PBS 缓冲液润洗 100  $\mu$ m 细胞滤器，用润湿后的 100  $\mu$ m 细胞滤器过滤细胞悬液样本，50 mL 离心管收集细胞悬液；
- 12) 用 10 mL PBS 缓冲液清洗组织处理管，并滤过 100  $\mu$ m 滤器，收集于步骤 11) 的 50 mL 离心管中；
- 13) 室温下 300 $\times$  g 细胞悬液离心 10 分钟，彻底弃掉上清液；
- 14) 用适当的 PB Buffer 重悬细胞至所需容量，以备进一步应用，重悬细胞用于原代细胞培养或流式细胞术；  
**⚠ 注：如重悬后有絮状物杂质，可使用 40  $\mu$ m 细胞滤器再次过滤。**
- 15) (可选)如需要进行红细胞裂解，可参照以下推荐的方法。  
(推荐) 用红细胞裂解液（索莱宝：#R1010）2 mL 对步骤 13) 处理后获得的细胞沉淀进行重悬，然后放置冰上孵育 1 ~ 3 min，接着用 9 mL 的 RPMI 1640 或 DMEM 终止，将细胞悬液 300 $\times$  g 离心 10 分钟，彻底弃去上清。

## 8 注意事项

- 1) 本试剂盒有效期为 12 个月，瑞沃德不保证过期产品的有效性；
- 2) 如组织解离后进行下游细胞培养，应保证在无菌条件下完成所有操作；
- 3) 酶解方案的 7.4.1 步骤 5)、6) 对实验结果影响较大，此操作不可省略；
- 4) Buffer D 具有低毒性，使用过程中要戴好手套避免接触到皮肤，如接触到皮肤需尽快用清水或肥皂水反复冲洗；
- 5) 由于天气原因收货时即使冰袋已溶解也不影响试剂盒性能，该试剂可接受 37  $^{\circ}$ C 放置 2 天。  
**\*注意：组织处理管不在美国销售。**

## 深圳市瑞沃德生命科技有限公司

网址：[www.rwds.com](http://www.rwds.com)

地址：深圳市南山区西丽街道西丽社区留新四路万科云城三期 C 区九栋 A 座 1901 房

邮编：518000

电话：400-966-9516

传真：+86-755-86146750

7\*24 小时售后热线：+86-755-86111281

售后邮箱：[service@rwds.com](mailto:service@rwds.com)