

动物组织低温解离试剂盒

(适用于单细胞测序)

使用说明书

目 录

| | |
|--------------|---|
| 目 录..... | 2 |
| I 产品概述..... | 3 |
| 1. 产品组分..... | 3 |
| 2. 自备材料..... | 3 |
| 3. 适用范围..... | 3 |
| II 实验步骤..... | 4 |
| 注意事项..... | 5 |



I 产品概述

“动物组织低温解离试剂盒 (6 rxn)” 可用于人类、大鼠、小鼠等多种动物组织的细胞悬液制备。目前市场中多数动物组织解离试剂盒的适用温度为 37 °C，但有文献报道细胞在 37 °C 下具有较高的代谢活性，在其解离过程中将不可避免的引发大量应激基因的高水平表达。本试剂盒含有低温活性蛋白水解酶，这是一种丝氨酸内蛋白酶，对天然和变性蛋白具有广泛的特异性，可在低温环境下解离制备单细胞悬液，能够有效的降低应激基因的表达以提高数据结果的准确性和可靠性。

本产品已经预先配置好高质量的酶溶液，不仅使用方便，还可以得到高活性、高得率的单细胞悬液。本产品的组分都经过严格的质量控制和功能验证，在最大程度上保证单细胞悬液的有效制备的同时，也能保持试验数据的准确性和可靠性，以应用于下游的 scRNA-seq (Single-Cell RNA sequencing) 实验。

1. 产品组分

| 名称 | 含量 |
|----------|---------------|
| Enzyme 1 | 960 μ l*6 |
| Buffer 1 | 40 μ l*6 |
| Buffer 2 | 7 mL |
| Buffer 3 | 70 μ L |

2. 自备材料

1. 带有能容纳 15mL 离心管的水平转子的离心机;
2. (低温)恒温混匀仪;
3. 滤网: 孔径 40 μ m;
4. EP 管: 15mL 、 50mL;
5. 一次性滴管、无菌剪刀等。

3. 适用范围

本产品适用于人、大小鼠等多种动物常规组织的单细胞悬液制备。仅本公司长期验证，适用的组织类型包括：人-肺、人-肠腹膜、小鼠-宫颈肿瘤等。



II 实验步骤

1. 将 Enzyme 1、Buffer 1、Buffer 2 和 Buffer 3 提前放置于 4°C 环境中进行解冻。

2. 取出待处理的组织样本，若是含有保护液的组织则直接置于培养皿中弃去保护液；若是含有冻存液的组织，则先将样本置于 37 °C 水浴中 2 min 后，再弃去冻存液；然后使用 DPBS 对组织进行洗涤，清除残余的血液等。

***以上均在冰上操作。**

3. 经 1、2 步骤处理过的组织转移至干净的培养皿中，加 200 ul 的 Buffer 2（使组织始终保持湿润状态），用无菌剪刀将组织尽量剪碎至乳糜状。

4. 将乳糜状的组织转移至 15mL 的 EP 管中，用移液器吸取 400 ul 的 Buffer 2 冲洗培养皿，并将液体转移至 15mL 的 EP 管中。

5. 重复步骤 4。

6. 在 15mL 的 EP 管中加入 960ul 的 Enzyme 1、40ul 的 Buffer 1 和 10μL 的 Buffer 3，用移液器充分吹打混匀后，将此 EP 管置于 6°C 恒温混匀仪上，消化 30min 后进行镜检。

***若细胞总量较少，可适当延长消化时间。**

7. 将 40μm 筛网组装到 50mL 的 EP 管上。先加入 5mL 的 DPBS（含 1% BSA），用一次性胶管反复吹打混匀，静置 5min，待组织沉淀沉于底部，使用 1mL 移液器吸取上部悬液，滴加到筛网上，使其缓慢过滤。

8. 重复步骤 7，将最后得到的约 10mL 体系转移至 15mL 的 EP 管后，500×g、4°C 离心 10min。

9. 离心结束后，小心吸出全部上清液（尽量不要有残余），然后用 500μl 的 DPBS（含 1% BSA）重悬镜检。

***若发现重悬液中存在红细胞或死细胞，采用红细胞裂解液或密度梯度离心法去除。**



注意事项

1. 本试剂盒仅适用于科研，不适用于临床检测。
2. 尽量避免试剂的反复冻融，建议到货后分装保存。
3. 整个操作步骤全程冰上进行。
4. 50 mL 离心管埋于冰中，将筛网置于管口，过滤时可将筛网稍稍倾斜 $15^{\circ}\sim 30^{\circ}$ ，以避免堵塞。针对组织消化液粘稠的样品，可划动或加预冷培养基反复稀释吹打后，进行两次过筛处理，注意第二次过筛需要缓慢滴加过滤，不能吹打或划动筛网。
5. 离心后，离心管轻拿轻放，不要扰动细胞沉淀。最后管底剩余的少量上清可使用 10 μl 量程的移液器进行吸取，注意不要接触到沉淀。

***考虑到样本、设备等因素的影响，可适当增大动物组织低温解离的酶解体系并提高其浓度。**

