



全皮肤解离试剂盒，人(92-01-0155)

[组分]

2.5 mL 酶 P

1 瓶酶 A (冻干粉)

1 瓶酶 D (冻干粉末)

30 mL 缓冲液 L

[规格] 50 次消化。

指定的消化次数适用于按照步骤二中的方案进行 4 毫米活检。

[储存条件] 到达后立即将等分的酶 P 保存在 -20 °C 下。所有其他成分到货后储存于 2-8 °C。

有效期标注在包装盒标签上。有关冻干成分复溶和复溶后储存的信息，请参阅第一节。

[原理]

通过将机械解离与维持组织结构完整性的细胞外粘附蛋白的酶降解相结合，可将人体整张皮肤解离成单细胞悬浮液。

真皮与表皮不分离。第一步，用酶浸泡人体皮肤，使细胞外基质降解。第二步，使用组织解离仪将单细胞从细胞外基质中分离出来。

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]

人体全皮肤解离试剂盒可从人体皮肤组织中温和、高效地生成单细胞悬浮液。该试剂盒特别适用于从不同的人体皮肤活检组织中分离成纤维细胞。此外，解离的细胞随后还可进行培养或分离。

[试剂和仪器要求]

- 细胞培养基，如含有稳定谷氨酰胺、10% 胎牛血清 (FBS)、10 mM HEPES、1% 青霉素/链霉素和素、1mM 丙酮酸钠和 1× 非必需氨基酸的 DMEM。
- 过滤器 (70 μ m)
- 组织解离器，自动组织解离器
- C 管
- 可选) 组织储存液
- 可选) 打孔活检工具 (如活检打孔器)
- 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。
- ▲ 本方案已针对消化乳房或腹部缩小手术后的成人皮肤进行了优化。
- ▲ 每次消化最多可使用三个活组织切片 (每个 4 毫米)。在处理较大的打孔活检组织时，应将活检组织切成最大直径为 4 毫米的小块。

一、试剂准备

1. 准备适当容量的等分酶 P，以避免反复冻融。将等分样品保存在 -20°C 下。
2. 用试剂盒提供的 3 mL 缓冲液 L 复溶小瓶中的冻干粉末，制备酶 D。准备适当容量的等分样品，以避免重复冻融。将等分样品保存在 -20°C 下。
3. 用试剂盒提供的 1 mL 缓冲液 L 复溶小瓶中的冻干粉，制备酶 A。准备适当容量的等分样品，以避免重复冻融。将等分样品保存在 -20°C 下。

二、解离步骤

1. 用适当的缓冲液或细胞培养基（如组织储存液）清洗人体皮肤组织样本。
2. 用手术刀小心刮去皮下脂肪。如果皮肤样本直径超过 4 毫米，则用工具（如活检打孔器）向下旋转，穿过表皮和真皮，取一个或多个直径为 4 毫米的打孔。将冲孔保存在适当的缓冲液或细胞培养基（如组织储存液）中，直到需要时为止。
3. 将 435 μL 缓冲液 L 和 12.5 μL 酶 P 加入 C 管中，小心混合。
▲ 注意：某些表位（如 CD4 和 CD8）对酶 P 敏感。如果单细胞悬液中仍有这些表位，则可省略酶 P 的添加，因为酶 P 会降低细胞产量（参见第 3 节中的表格）。
4. 在 C 管中加入 50 μL 酶 D 和 2.5 μL 酶 A，小心混合（缓冲液保持在管底）。
▲ 注：酶 A 和酶 D 可在加入 C 管前预混。不要将酶 P 与酶 A 或酶 D 预混。
5. 将一份皮肤组织样本（4 毫米）移入装有混合酶的 C 管中，并盖紧。
▲ 注意：将 C 管盖紧，不要超过第一个阻力。
▲ 注：如果在步骤 6 中选择过夜孵育，则每个 C 管最多可处理 3 个样本（每个样本 4 毫米）。

6. 在 37 °C 水浴中孵育样品 3 小时或过夜。

▲ 注：孵育时间越长，细胞产量越高。

7. 孵育后，加入 0.5 毫升冷细胞培养基稀释样品。

8. 紧闭 C 管，将其倒扣在组织解离仪的套管上。

▲ 注意：关闭 C 管时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。

9. 运行解离程序 h_skin_01。

▲ 注意：解离步骤后细胞外基质并未完全解离，但不要重复该步骤，否则会降低细胞产量。

10. 程序结束后，将 C 管组织解离器中取出。

11. 进行短暂的离心步骤，收集管底的样本材料。

12. 将细胞悬浮液转移到放置在 15 mL 离心管上的 70 μm 预分离过滤器上。

▲ 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。

13. 用 4 mL 冷细胞培养基清洗过滤器。

▲ 注：（可选）若要收集 C 管中的剩余细胞，先将冷培养基加入 C 管，然后再加入过滤器。

14. 丢弃过滤器，在 4 °C 下以 300×g 离心细胞悬浮液 10 分钟。完全吸出上清液。

15. 用培养基或适当的缓冲液重悬细胞至进一步应用所需的体积，例如，用 PEB 缓冲液重悬细胞用于磁性细胞分离或流式细胞仪。

16. 立即处理细胞，以便进一步应用。

三、附录

每个样本的目标细胞产量

下表列出了根据孵育时间和酶 P 添加量对成人腹部皮肤每 4 毫米冲孔活检样本目标细胞产量的依赖关系。

	孵育 3h	过夜孵育
加酶 P	120,000 total cells 40,000 CD90+ 10,000 CD3+ 4,000 CD1c+	380,000 total cells 80,000 CD90+ 20,000 CD3+ 6,000 CD1c+
不加酶 P	45,000 total cells 10,000 CD90+ 3,500 CD3+ 1,500 CD1c+	110,000 total cells 22,000 CD90+ 8,000 CD3+ 3,000 CD1c+

典型染色

解离过程后保持完整的表位有 CD90（成纤维细胞）、CD45（白细胞）、CD3（T 细胞）和 CD1c（树突状细胞）等。解离过程后会降解的表位有 CD4 和 CD8 等。省略酶 P 可以避免降解，但产量会降低。