

## 脾脏解离试剂盒，小鼠(92-01-0125)

### [组分]

13 mL 缓冲液 S (20× 储液)

1 瓶酶 D (冻干粉末)

1 瓶酶 A (冻干粉末)

[规格] 50 次消化。

按照第二节中的方案消化平均重量为 80-140 毫克的脾脏时，指定的消化次数有效。

[储存条件] 到货后，将所有成分保存在 2-8 °C 下。在包装盒标签上标明的日期前溶解所有成分。

有关冻干成分的复溶和复溶后储存的信息，请参阅第一节。

### [原理]

脾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。

使用试剂盒组件对脾脏进行酶解，并使用组织解离器进行机械解离步骤。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]

小鼠脾脏解离试剂盒专为温和、快速、高效地生成小鼠脾脏单细胞悬液而设计。该试剂盒经过优化，可获得高产量的白细胞，尤其是树突状细胞，同时保留所有细胞表面表位。可使用磁分选技术分离离体细胞。此外，还可在体外分析单细胞悬液的表型分布，并进行其他功能、遗传或蛋白质组研究。

### [试剂和仪器要求]

- PBS: pH 值为 7.2 的磷酸盐缓冲液
- PEB 缓冲液: 配制含有 pH 7.2 PBS、0.5% 牛血清白蛋白 (BSA) 和 2 mM EDTA 的溶液。将缓冲液置于 2-8 °C。始终使用新鲜配制的缓冲液。
- 预分离过滤器, 30 μm
- 试管混匀仪与 37°C 培养箱结合使用
- C 管
- 组织解离器, 自动组织解离器, 带有加热模块的组织解离器
- (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。
- ▲ 用约 2.5 毫升酶混合物分离一个小鼠脾脏。一个小鼠脾脏的重量为 80-140 毫克 (雌性 BALB/c 小鼠, 6-7 周大)。
- ▲ 在解离前从解剖的小鼠脾脏中去除脂肪组织。

## 一、试剂准备

1. 例如，将 1 mL 20× 缓冲溶液 S 无菌加入 19 mL 无菌蒸馏水中，制备 1× 缓冲溶液 S。保存在 2-8 °C。

▲ 注意：在无菌条件下操作。

2. 用 3 mL 1× 缓冲溶液 S 复溶小瓶中的冻干粉，制备酶 D。将等分样品保存在 -20 °C 下。复溶后的溶液可稳定保存 6 个月。对于组织解离后的细胞培养实验，应在等分前对酶 D 进行无菌过滤。

3. 用 1 mL 1× 缓冲溶液 S 复溶小瓶中的冻干粉，制备酶 A。准备适当容量的等分样品，以避免重复冻融循环。将等分样品保存在 -20 °C 下。本溶液复溶后可稳定保存 6 个月。

## 二、脾脏解离步骤

1. 在 C 管中加入 2.4 mL 1× 缓冲液 S、50 μL 酶 D 和 15 μL 酶 A，制备酶混合物。

2. 将一个小鼠脾脏转移到装有酶混合物的 C 管中。

3. 紧闭 C 管并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。

4. 运行解离程序 m\_spleen\_02。

如果使用带加热器的组织解离器的加热功能，则运行程序 37C\_m\_SDK\_1，并继续执行步骤 9。

5. 程序结束后，将 C 管从组织解离器上取下。

▲ 注意：此步骤后脾脏不会完全离解。如果出现脾脏完全未离解的意外情况，请重复步骤 4 和 5。

6. 使用样品混悬仪在 37 °C 温度下连续旋转孵育样品 15 分钟。

▲ 注：样品混悬仪以大约 12 转/分钟的速度永久运行。

7. 将 C 管倒插在组织解离仪套管上。

▲ 注意：必须确保样品材料位于转子/定子区域内。

8. 运行解离程序 m\_spleen\_03。

9. 程序结束后，从组织解离器上拆下 C 管。

10. (可选) 执行短暂的离心步骤，收集试管底部的样本材料。

11. 重新悬浮样品，将细胞悬浮液转移到放置在 15 mL 离心管上的 30  $\mu\text{m}$  预分离过滤器上。

▲ 注：可通过 C 管盖中央的隔膜密封开口，用移液管从封闭的 C 管中取出离体组织。使用 ART 1000 REACH 1000  $\mu\text{L}$  移液器吸头。

12. 用 2.5 mL 1 $\times$  缓冲液 S 冲洗过滤器。

13. 丢弃过滤器，将细胞悬浮液在 300 $\times$ g 转速下离心 10 分钟。完全吸取上清液。

14. 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。

15. 立即处理细胞，以便进一步应用。