

## 脑肿瘤解离试剂盒 (P)，人和小鼠(92-01-0128)

### [组分]

6 瓶，包含

1.25 mL 酶 N

2×50 mL 缓冲液 X(无菌)

1.5 mL 缓冲液 Y(无菌)

1 瓶酶 A(冻干粉)

1 mL 缓冲液 A

[规格] 25 次消化（4 mL 体系）。

[储存条件] 脑肿瘤解离试剂盒 (P) 中的酶 N 到货后，立即将等分的酶 N 保存在 -20 °C 下。

在小瓶标签上标明的日期之前溶解酶 A。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。有关冻干成分溶解和溶解后储存的信息，请参阅第一节。

### [原理]

脑肿瘤组织可通过机械解离与细胞外基质酶解相结合的方法解离成单细胞悬浮液。

使用试剂盒组件对肿瘤组织进行酶解，并使用组织处理器进行机械解离步骤。解离后，将样本置于过滤器上，以去除单细胞悬液中剩余的较大颗粒。可选择使用髓鞘去除磁珠 II 去除髓鞘，以改善下游应用（如分子和流式细胞分析或细胞分离）的结果。

## [背景信息]

脑肿瘤解离试剂盒（P）和相应的解离程序设计用于从人类和小鼠脑肿瘤中温和、快速、高效地生成单细胞悬浮液。这种可靠的标准化方案是成功进行磁性细胞分选等下游应用的先决条件。肿瘤内特定细胞群（如癌症干细胞）的分离和表征对于分析癌症潜能和开发疗法非常重要。

在处理来自人、小鼠或异种移植肿瘤的免疫细胞时，建议分别使用人或小鼠肿瘤解离试剂盒。

## [试剂和仪器要求]

- 组织处理器和 C 管
- 含  $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Mg}^{2+}$  的 HBSS，以下简称 HBSS (w)。
- 样品混悬仪与 37 °C 培养箱结合使用
- 筛网 (70  $\mu\text{m}$ )
- 15 毫升和 50 毫升离心管
- 可选) 髓鞘碎片去除磁珠
- 可选) ART® 1000 REACH™ 移液器吸头用于从封闭的 C 管中去除解离物质。
- 可选) 组织储存液。

## [步骤]

### 一、试剂准备

▲ 下面给出的体积适用于最多 800 毫克的起始组织材料。当处理少于 800 毫克时，请使用与所示相同的体积。当处理量超过 800 毫克时，应相应地增加所有试剂体积和总体积。

▲ 每个 C 管最多可处理 1600 毫克组织材料。

▲ 总体积不应超过 10 mL，最小体积为 4 mL。

1. 酶 N 待使用。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 °C 下。该溶液可稳定保存 6 个月。用 1 mL 缓冲液 A 重悬标有酶 A 的小瓶中的冻干粉末。然后将该溶液等分并保存在 -20 °C 下备用。

|         | 800 mg 组织所需体积 |               |             |           |
|---------|---------------|---------------|-------------|-----------|
| BTDK(P) | 酶 N 50 µL     | 缓冲液 X 3890 µL | 缓冲液 Y 40 µL | 酶 A 20 µL |

## 二、脑肿瘤解离步骤

▲ 本方案描述的是人类原发性胶质母细胞瘤的解离过程，但原则上也可用于其他小鼠和人类脑肿瘤组织类型。

▲ 在确定肿瘤样本重量之前，先去除坏死组织。

▲ 在组织解离后进行细胞培养实验时，所有步骤均应在无菌条件下进行。

1. 将适当体积的缓冲液 X (参见第一节中的表格) 转移到 C 管中，使用前在 37 °C 下预热 10-15 分钟。

▲ 注意：如果使用带加热器的组织处理器的加热功能，则无需预热。

2. 将组织转移到装有预热缓冲液 X 的 C 管中。

▲ 注意：如果使用的是非常坚固的组织，则应先使用手术刀将其切成小块。

3. 在 C 管中加入适量的酶 N、缓冲液 Y 和酶 A (参见第一节中的表格) 并轻轻混匀。

4. 紧闭 C 管，将其倒扣在组织处理器的套管上。

▲ 注意：必须确保样品材料位于转子/定子区域。

5. 如果使用带加热器的组织处理器的加热功能，则运行程序 37C\_BTDC\_1，并继续执行步骤 14。

如果使用不带加热功能的组织处理器，则运行程序 h\_tumor\_02，然后继续执行步骤 6。

6. 程序结束后，从组织处理器上取下 C 管。

7. 使用样品混悬仪在 37 °C 温度下连续缓慢旋转孵育样品 15 分钟。

8. 将 C 管倒插在组织处理器的套管上。

9. 运行解离程序 h\_tumor\_03。

10. 程序结束后，将 C 管从组织处理器上取下。

11. 使用样品混悬仪在 37 °C 下连续缓慢旋转，孵育样品 10 分钟。

12. 将 C 管倒扣在组织处理器的套管上。

13. 运行解离程序 m\_brain\_01。

14. 程序结束后，将 C 管从组织处理器上取下。

15. 短暂离心，收集离心管底部的样本。

16. 重新悬浮样品并将其转入放置在 50 mL 离心管上的筛网（70 μm）中。

▲ 注：使用前用缓冲液湿润筛网（70 μm）。

▲ 注意：当增加试剂量和总体积时，也要增加筛网（70 μm）的数量。一个筛网（70 μm）最多可用于 4 mL。

▲ 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。

▲ 注意：直径大于 70  $\mu\text{m}$  的细胞可能会丢失。要在流道中获得这些细胞，请使用网眼大小合适的细胞过滤器。

17. 用 20 mL HBSS (w) 冲洗筛网 (70  $\mu\text{m}$ ) 。

▲ 注：当处理超过 800 毫克人脑时，用适量的 HBSS (w)（酶溶液体积的五倍）冲洗筛网 (70  $\mu\text{m}$ )。必要时分割样品。

18. 丢弃筛网 (70  $\mu\text{m}$ )，室温下以 300 $\times$ g 离心细胞悬浮液 10 分钟。完全吸出上清液。

19. 用缓冲液重悬细胞至进一步应用所需的体积。

20. (可选) 如果存在髓鞘，建议使用髓鞘去除磁珠。

21. 应立即处理细胞，以便进一步应用。

### 三、附录

#### 制作合适的巴斯德移液管

手动解离方案需要三支开口直径递减的巴斯德移液管。第一支移液管的开口应呈圆形，开口大小不应明显减小。最小的开口不应小于 0.5 毫米，以免细胞因压力过大而被迫通过。要使开口逐渐变小，可在火焰中快速旋转移液管，使其在火焰中抛光几秒钟。如果使用橡胶吸盘，则更容易制作。时间过长可能会使开口熔化。边缘应为圆形。

#### 活细胞的产量太低（解离不充分）

确保在整个培养过程中充分搅拌组织块，不要让其粘在离心管底部。必要时，在加入混合酶后翻动或倒转离心管。在 37  $^{\circ}\text{C}$  的工作步骤中，使用样品混悬仪非常方便。将悬浮液倒入孔径适合目标细胞大小的细胞过滤器中。



**粘丝或颗粒会抑制洗涤后颗粒的形成**

每 2 mL 再加入 30  $\mu$ L 酶混合物，37  $^{\circ}$ C 温育 5-10 分钟，离心，再洗。

**单细胞悬液只含有死细胞**

确保巴斯德移液管开口不要太小。移液速度要慢，不要搅动细胞。避免产生气泡。严格遵守操作规程。

**使用磁珠分选后纯度较低**

如果存在髓鞘，建议使用髓鞘去除磁珠，因为髓鞘会影响抗体的特异性结合，从而影响细胞的分离。