

组织单细胞悬液制备操作指导书

文件版本：1.0

版本历史

文件 版本	修订 日期	修订内容摘要
1.0	2021 年 3 月	◆ 首次发布

文件下载地址: www.mgi-tech.com/download/files

目录

第一章 小鼠心脏组织消化.....	1
1.1 概述.....	1
1.2 注意事项.....	1
1.3 组织描述.....	1
1.4 试剂耗材.....	1
1.5 试剂配制.....	1
1.6 消化方案.....	1
1.7 红细胞裂解.....	2
1.8 结果.....	3
1.9 常见问题及解决方案.....	3
第二章 小鼠肝脏组织消化.....	4
2.1 概述.....	4
2.2 注意事项.....	4
2.3 组织描述.....	4
2.4 试剂耗材.....	4
2.5 试剂配制.....	4
2.6 消化方案.....	4
2.7 红细胞裂解.....	5
2.8 结果.....	6
2.9 常见问题及解决方案.....	6
第三章 小鼠脾脏组织消化.....	7
3.1 概述.....	7
3.2 注意事项.....	7
3.3 组织描述.....	7
3.4 试剂耗材.....	7
3.5 试剂配制.....	7
3.6 消化方案.....	7
3.7 红细胞裂解.....	8
3.8 结果.....	9
3.9 常见问题及解决方案.....	9
第四章 小鼠肺组织消化.....	10

4.1	概述.....	10
4.2	注意事项.....	10
4.3	组织描述.....	10
4.4	试剂耗材.....	10
4.5	试剂配制.....	10
4.6	消化方案.....	10
4.7	红细胞裂解	11
4.8	结果.....	12
4.9	常见问题及解决方案	12
第五章 小鼠肾脏组织消化.....		13
5.1	概述.....	13
5.2	注意事项.....	13
5.3	组织描述.....	13
5.4	试剂耗材.....	13
5.5	试剂配制.....	13
5.6	消化方案.....	13
5.7	红细胞裂解	14
5.8	结果.....	15
5.9	常见问题及解决方案	15
第六章 小鼠小肠组织消化.....		16
6.1	概述.....	16
6.2	注意事项.....	16
6.3	组织描述.....	16
6.4	试剂耗材.....	16
6.5	试剂配制.....	16
6.6	消化方案.....	16
6.7	红细胞裂解	17
6.8	结果.....	18
6.9	常见问题及解决方案	18
第七章 小鼠胃组织消化.....		19
7.1	概述.....	19
7.2	注意事项.....	19
7.3	组织描述.....	19

7.4	试剂耗材.....	19
7.5	试剂配制.....	19
7.6	消化方案.....	19
7.7	红细胞裂解.....	20
7.8	结果.....	21
7.9	常见问题及解决方案.....	21
第八章 人胃组织消化		22
8.1	概述.....	22
8.2	注意事项.....	22
8.3	组织描述.....	22
8.4	试剂耗材.....	22
8.5	试剂配制.....	22
8.6	消化方案.....	22
8.7	红细胞裂解.....	23
8.8	结果.....	24
8.9	常见问题及解决方案.....	24
第九章 人胃癌组织消化		25
9.1	概述.....	25
9.2	注意事项.....	25
9.3	组织描述.....	25
9.4	试剂耗材.....	25
9.5	试剂配制.....	25
9.6	消化方案.....	25
9.7	红细胞裂解.....	26
9.8	结果.....	27
9.9	常见问题及解决方案.....	27
第十章 人血液 PBMC 分离		28
10.1	概述.....	28
10.2	注意事项.....	28
10.3	试剂耗材.....	28
10.4	分离方案.....	28
10.5	红细胞裂解.....	29
10.6	结果.....	30

10.7	常见问题及解决方案	30
第十一章	液氮冻存组织细胞核制备	31
11.1	概述	31
11.2	注意事项	31
11.3	组织描述	31
11.4	试剂耗材	32
11.5	试剂配制	33
11.6	处理方案	33
11.7	结果	34
11.8	常见问题及解决方案	34
附录		35
附录 A	死细胞去除方案	35
A-1	概述	35
A-2	试剂耗材	35
A-3	死细胞去除柱子选用	35
A-4	处理方案	35
A-5	常见问题及解决方案	36
附录 B	其他组织消化条件	37

第一章 小鼠心脏组织消化

1.1 概述

本章介绍了一种使用消化酶将新鲜的小鼠心脏组织解离成单细胞悬液的推荐方案。如果要消化其他组织，可能需要对方案中某些条件进行修改（例如消化时间、消化酶种类、消化酶浓度等）。

1.2 注意事项

- ◆ 自组织离体起，消化过程需全程在超净工作台中进行且保持低温（烘箱除外）。
- ◆ 请按照材料供应商及当地实验室规范处理该方案所产生的生物废弃物。

1.3 组织描述

组织描述如下：

表 1-1 组织描述

组织来源	组织类型	组织大小
小鼠	心脏	100~300 mm ³

1.4 试剂耗材

表 1-2 试剂耗材

品牌	物品名称	货号
Sigma	胶原酶II	C6885
Sigma	胶原酶IV	C5138
Gibco	PBS	10010031
Sysmex	30 μm 细胞筛	04-004-2326
Corning	35 mm×10 mm 培养皿	CLS3294
Corning	15 mL 离心管	CLS430055
TIANGEN	红细胞裂解液	RT122
Biologix	3 mL 巴氏吸管	30-0138A1

1.5 试剂配制

表 1-3 试剂配制

试剂	配制方法	保存条件
10% 胶原酶II（4℃使用）	10 mL PBS 中加入 0.1 g 胶原酶II粉末	-25℃~-15℃
10% 胶原酶IV（4℃使用）	10 mL PBS 中加入 0.1 g 胶原酶IV粉末	-25℃~-15℃

1.6 消化方案

- 1) 从解剖完成的小鼠体内小心取出心脏组织至培养皿中，培养皿置于冰上，全程保持低温，加2 mL 4℃预冷的PBS冲洗组织，洗去血污，弃去液体。

- 2) 重复洗涤一次。
- 3) 将冲洗干净的组织放入新的培养皿中，培养皿置于冰上，加入2 mL 4℃预冷PBS至培养皿中，用干净的解剖剪刀将组织充分剪碎，剪碎至0.5 mm³左右。
- 4) 准备好15 mL 离心管，做好标记，用巴氏吸管将剪碎的组织连同PBS一同转移至15 mL 离心管，在培养皿中再加入1 mL 4℃预冷PBS，冲洗并悬浮剩余组织，转移至15 mL 离心管中，离心管中加4℃预冷PBS至6.5 mL，加入1 mL 10% 胶原酶II和2.5 mL 10% 胶原酶IV。
- 5) 加入完成后缓慢颠倒混匀，放入37℃烘箱中混匀仪上，转速设置为15 rpm，消化30 min。

 （根据对于细胞总量及活率的需求可自行调整消化时间。）

- 6) 消化结束后，取30 μm细胞筛放入15 mL 离心管中，用1 mL 4℃预冷PBS润洗，润洗完成后用巴氏吸管将管中所有样本过30 μm细胞筛并收集液体；液体均通过30 μm细胞筛后，用2 mL PBS冲洗解离用的离心管，过30 μm细胞筛，收集得到细胞悬液。

 （若30 μm细胞筛过滤困难，可先用70 μm细胞筛，再使用30 μm细胞筛。）

- 7) 设置离心机离心条件：300 g，7 min，4℃。离心，吸去上清，立即进行红细胞裂解。

1.7 红细胞裂解

- 1) 在细胞沉淀中加入3 mL 红细胞裂解液，扩口吸头吹打混匀，室温静置10 min。
- 2) 加入7 mL 4℃预冷 PBS轻微颠倒混匀，离心机设置为300 g，7 min，4℃。离心，吸去上清。

 （若细胞沉淀中仍存在红细胞，重复上述步骤1）和2）。）

- 3) 加入3 mL PBS重悬细胞，台盼蓝染色测定细胞浓度和活率。

 （若活率低于70%，参照附录一死细胞去除方案进行死细胞去除操作。）

1.8 结果

小鼠心脏组织消化后一般得到的细胞数为 $0.5 \times 10^6 \sim 1.5 \times 10^6$ 个，使用台盼蓝染色后计算细胞活率一般在70%~90%。

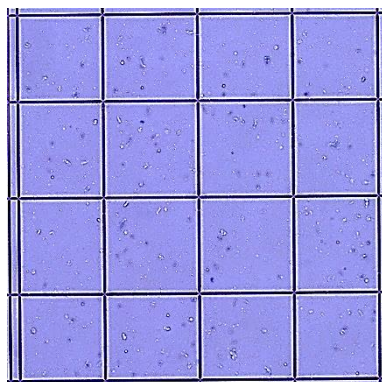


图 1-1 台盼蓝染色图

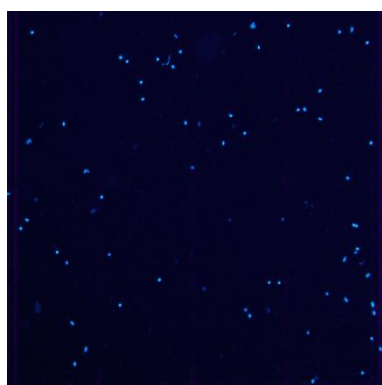


图 1-2 DAPI 染色图

1.9 常见问题及解决方案

表 1-4 常见问题及解决方案

常见问题	解决方案
细胞活率低	缩短消化时间
	优化消化方案
	使用去除死细胞试剂盒
背景碎片多	调整离心转速清洗
	使用小孔径细胞筛过滤
	流式细胞术筛选
细胞聚团	PBS 中加入适当浓度 BSA (推荐 0.04%)
	消化酶中加入少量 Dnase I

第二章 小鼠肝脏组织消化

2.1 概述

本章介绍了一种使用消化酶将新鲜的小鼠肝脏组织解离成单细胞悬液的推荐方案。如果要消化其他组织，可能需要对方案中某些条件进行修改（例如消化时间、消化酶种类、消化酶浓度等）。

2.2 注意事项

- ◆ 自组织离体起，消化过程需全程在超净工作台中进行且保持低温（烘箱除外）。
- ◆ 请按照材料供应商及当地实验室规范处理该方案所产生的生物废弃物。

2.3 组织描述

组织描述如下：

表 2-1 组织描述

组织来源	组织类型	组织大小
小鼠	肝脏	300~500 mm ³

2.4 试剂耗材

表 2-2 试剂耗材

品牌	物品名称	货号
Sangon	胶原酶I	A004194
Sigma	胶原酶II	C6885
Gibco	PBS	10010031
Sysmex	30 μm 细胞筛	04-004-2326
Corning	35 mm×10 mm 培养皿	CLS3294
Corning	15 mL 离心管	CLS430055
TIANGEN	红细胞裂解液	RT122
Biologix	3 mL 巴氏吸管	30-0138A1

2.5 试剂配制

表 2-3 试剂配制

试剂	配制方法	保存方法
10% 胶原酶I（4℃使用）	10 mL PBS 中加入 0.1 g 胶原酶I粉末	-25℃~-15℃
10% 胶原酶II（4℃使用）	10 mL PBS 中加入 0.1 g 胶原酶II粉末	-25℃~-15℃

2.6 消化方案

- 1) 从解剖完成的小鼠体内小心取出肝脏组织至培养皿中，培养皿置于冰上，全程保持低温，加2 mL 4℃预冷的PBS冲洗组织，洗去血污，弃去液体。

- 2) 重复洗涤一次。
- 3) 将冲洗干净组织放入新的培养皿中，培养皿置于冰上加入2 mL 4℃预冷PBS至培养皿中，用干净的解剖剪刀将组织充分剪碎，剪碎至0.5 mm³左右。
- 4) 准备好15 mL 离心管，做好标记，用巴氏吸管将剪碎的组织连同PBS一同转移至15 mL 离心管，在培养皿中再加入1 mL 4℃预冷PBS，冲洗并重悬剩余组织，转移至离心管中，离心管中加4℃预冷PBS至8 mL，加入1 mL 10% 胶原酶I和1 mL 10% 胶原酶II。
- 5) 加入完成后缓慢颠倒混匀，放入37℃烘箱中混匀仪上，转速设置为15 rpm，消化30 min。

 (根据对于细胞总量及活率的需求可自行调整消化时间。)

- 6) 消化结束后，取30 μm细胞筛放入15 mL 离心管中，用1 mL 4℃预冷PBS润洗，润洗完成后用巴氏吸管将管中所有样本过30 μm细胞筛并收集液体；液体均通过30 μm细胞筛后，用2 mL PBS冲洗解离用的离心管，过30 μm细胞筛，收集得到细胞悬液。

 (若30 μm细胞筛过滤困难，可先用70 μm细胞筛，再使用30 μm细胞筛。)

- 7) 设置离心机离心条件：300 g，7 min，4℃。离心，吸去上清，立即进行红细胞裂解。

2.7 红细胞裂解

- 1) 在细胞沉淀中加入3 mL 红细胞裂解液，扩口吸头吹打混匀，室温静置10 min。
- 2) 加入7 mL 4℃预冷 PBS轻微颠倒混匀，离心机设置为300 g，7 min，4℃。离心，吸去上清。

 (若细胞沉淀中仍存在红细胞，重复上述步骤1)和2)。

- 3) 加入3 mL PBS重悬细胞，台盼蓝染色测定细胞浓度和活率。

 (若活率低于70%，参照附录一死细胞去除方案进行死细胞去除操作。)

2.8 结果

小鼠肝脏组织消化后一般得到的细胞数为 $0.5 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$ 个，使用台盼蓝染色后计算细胞活率一般在75%~90%。

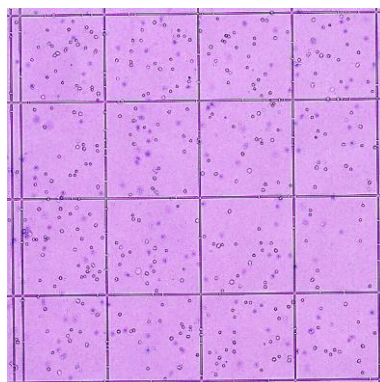


图 2-1 台盼蓝染色图



图 2-2 DAPI 染色图

2.9 常见问题及解决方案

表 2-4 常见问题及解决方案

常见问题	解决方案
细胞活率低	缩短消化时间
	优化消化方案
	使用去除死细胞试剂盒
背景碎片多	调整离心转速清洗
	使用小孔径细胞筛过滤
	流式细胞术筛选
细胞聚团	PBS 中加入适当浓度 BSA (推荐 0.04%)
	消化酶中加入少量 Dnase I

第三章 小鼠脾脏组织消化

3.1 概述

本章介绍了一种使用消化酶将新鲜的小鼠脾脏组织解离成单细胞悬液的推荐方案。如果要消化其他组织，可能需要对方案中某些条件进行修改（例如消化时间、消化酶种类、消化酶浓度等）。

3.2 注意事项

- ◆ 自组织离体起，消化过程需全程在超净工作台中进行且保持低温（烘箱除外）。
- ◆ 请按照材料供应商及当地实验室规范处理该方案所产生的生物废弃物。

3.3 组织描述

组织描述如下：

表 3-1 组织描述

组织来源	组织类型	组织大小
小鼠	脾脏	50~100 mm ³

3.4 试剂耗材

表 3-2 试剂耗材

品牌	物品名称	货号
Sigma	胶原酶通用型	C0130
Sangon	胰蛋白酶	A610629
Gibco	PBS	10010031
Sysmex	30 μm 细胞筛	04-004-2326
Corning	35 mm×10 mm 培养皿	CLS3294
Corning	15 mL 离心管	CLS430055
TIANGEN	红细胞裂解液	RT122
Biologix	3 mL 巴氏吸管	30-0138A1

3.5 试剂配制

表 3-3 试剂配制

试剂	配制方法	保存方法
10% 胶原酶通用（4℃使用）	10 mL PBS 中加入 0.1 g 胶原酶通用型粉末	-25℃~-15℃
10% 胰蛋白酶（4℃使用）	10 mL PBS 中加入 0.1 g 胰蛋白酶粉末	-25℃~-15℃

3.6 消化方案

- 1) 从解剖完成小鼠体内小心取出脾脏组织至培养皿中，培养皿置于冰上，全程保持低温，加2 mL 4℃预冷的PBS冲洗组织，洗去血污，弃去液体。

- 2) 重复洗涤一次。
- 3) 将冲洗干净组织放入新的培养皿中，培养皿置于冰上，加入2 mL 4℃预冷PBS至培养皿中，用干净的解剖剪刀将组织充分剪碎，剪碎至0.5 mm³左右。
- 4) 准备好15 mL 离心管，做好标记，用巴氏吸管将剪碎的组织连同PBS一同转移至15 mL 离心管，在培养皿中再加入1 mL 4℃预冷PBS，冲洗重悬剩余组织，转移至离心管中，离心管中加4℃预冷PBS至7 mL，加入1.5 mL 10% 胶原酶通用和1.5 mL 10% 胰蛋白酶。
- 5) 加入完成后缓慢颠倒混匀，放入37℃烘箱中混匀仪上，转速设置为15 rpm，消化30 min。

 （根据对于细胞总量及活率的需求可自行调整消化时间。）

- 6) 消化结束后，取30 μm细胞筛放入15 mL 离心管中，用1 mL 4℃预冷PBS润洗，润洗完成后用巴氏吸管将管中所有样本过30 μm细胞筛并收集液体；液体均通过30 μm细胞筛后，用2 mL PBS冲洗解离用的离心管，过30 μm细胞筛，收集得到细胞悬液。

 （若30 μm细胞筛过滤困难，可先用70 μm细胞筛，再使用30 μm细胞筛。）

- 7) 设置离心机离心条件：300 g，7 min，4℃。离心，吸去上清，立即进行红细胞裂解。

3.7 红细胞裂解

- 1) 在细胞沉淀中加入3 mL 红细胞裂解液，扩口吸头吹打混匀，室温静置10 min。
- 2) 加入7 mL 4℃预冷 PBS轻微颠倒混匀，离心机300 g 7 min 4℃离心，吸去上清。

 （若细胞沉淀中仍存在红细胞，重复上述步骤1)和2)。）

- 3) 加入3 mL PBS重悬细胞，台盼蓝染色测定细胞浓度和活率。

 （若活率低于70%，参照附录一死细胞去除方案进行死细胞去除操作。）

3.8 结果

小鼠脾脏组织消化后一般得到的细胞数为 $1 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$ 个，使用台盼蓝染色后计算细胞活率一般在75%~90%。

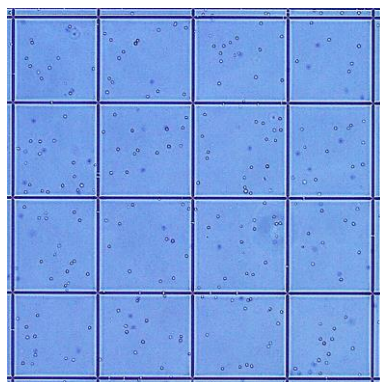


图 3-1 台盼蓝染色图

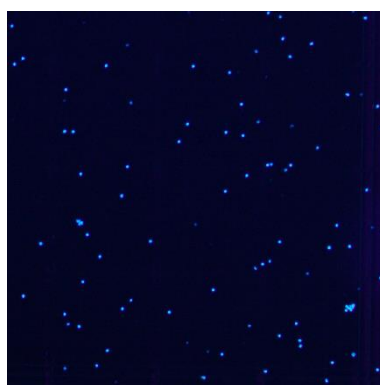


图 3-2 DAPI 染色图

3.9 常见问题及解决方案

表 3-4 常见问题及解决方案

常见问题	解决方案
细胞活率低	缩短消化时间
	优化消化方案
	使用去除死细胞试剂盒
背景碎片多	调整离心转速清洗
	使用小孔径细胞筛过滤
	流式细胞术筛选
细胞聚团	PBS 中加入适当浓度 BSA (推荐 0.04%)
	消化酶中加入少量 Dnase I

第四章 小鼠肺组织消化

4.1 概述

本章介绍了一种使用消化酶将新鲜的小鼠肺组织解离成单细胞悬液的推荐方案。如果要消化其他组织，可能需要对方案中某些条件进行修改（例如消化时间、消化酶种类、消化酶浓度等）。

4.2 注意事项

- ◆ 自组织离体起，消化过程需全程在超净工作台中进行且保持低温（烘箱除外）。
- ◆ 请按照材料供应商及当地实验室规范处理该方案所产生的生物废弃物。

4.3 组织描述

组织描述如下：

表 4-1 组织描述

组织来源	组织类型	组织大小
小鼠	肺	300~500 mm ³

4.4 试剂耗材

表 4-2 试剂耗材

品牌	物品名称	货号
Sigma	胶原酶II	C6885
Sigma	胶原酶IV	C5138
Gibco	PBS	10010031
Sysmex	30 μ m 细胞筛	04-004-2326
Corning	35 mm×10 mm 培养皿	CLS3294
Corning	15 mL 离心管	CLS430055
TIANGEN	红细胞裂解液	RT122
Biologix	3 mL 巴氏吸管	30-0138A1

4.5 试剂配制

表 4-3 试剂配制

试剂	配制方法	保存条件
10% 胶原酶II（4℃使用）	10 mL PBS 中加入 0.1 g 胶原酶II粉末	-25℃~-15℃
10% 胶原酶IV（4℃使用）	10 mL PBS 中加入 0.1 g 胶原酶IV粉末	-25℃~-15℃

4.6 消化方案

- 1) 从解剖完成小鼠体内小心取出肺组织至培养皿中，培养皿置于冰上，全程保持低温，加2 mL 4℃预冷的PBS冲洗组织，洗去血污，弃去液体。

- 2) 重复洗涤一次。
- 3) 将冲洗干净组织放入新的培养皿中，培养皿置于冰上，加入2 mL 4℃预冷PBS至培养皿中，用干净的解剖剪刀将组织充分剪碎，剪碎至0.5 mm³左右。
- 4) 准备好15 mL 离心管，做好标记，用巴氏吸管将剪碎的组织连同PBS一同转移至15 mL 离心管，在培养皿中再加入1 mL 4℃预冷PBS，冲洗重悬剩余组织，转移至离心管中，离心管中加4℃预冷PBS至6.5 mL，加入1 mL 10% 胶原酶II和2.5 mL 10% 胶原酶IV。
- 5) 加入完成后缓慢颠倒混匀，放入37℃烘箱中混匀仪上，转速设置为15 rpm，消化30 min。

 (根据对于细胞总量及活率的需求可自行调整消化时间。)

- 6) 消化结束后，取30 μm细胞筛放入15 mL 离心管中，用1 mL 4℃预冷PBS润洗，润洗完成后用巴氏吸管将管中所有样本过30 μm细胞筛并收集液体；液体均通过30 μm细胞筛后，用2 mL PBS冲洗解离用的离心管，过30 μm细胞筛，收集得到细胞悬液。

 (若30 μm细胞筛过滤困难，可先用70 μm细胞筛，再使用30 μm细胞筛。)

- 7) 设置离心机离心条件：300 g，7 min，4℃。离心，吸去上清，立即进行红细胞裂解。

4.7 红细胞裂解

- 1) 在细胞沉淀中加入3 mL 红细胞裂解液，扩口吸头吹打混匀，室温静置10 min。
- 2) 加入7 mL 4℃预冷 PBS轻微颠倒混匀，离心机300 g 7 min 4℃离心，吸去上清。

 (若细胞沉淀中仍存在红细胞，重复上述步骤1)和2)。

- 3) 加入3 mL PBS重悬细胞，台盼蓝染色测定细胞浓度和活率。

 (若活率低于70%，参照附录一死细胞去除方案进行死细胞去除操作。)

4.8 结果

小鼠肺组织消化后一般得到的细胞数为 $1 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$ 个，使用台盼蓝染色后计算细胞活率一般在75%~90%。

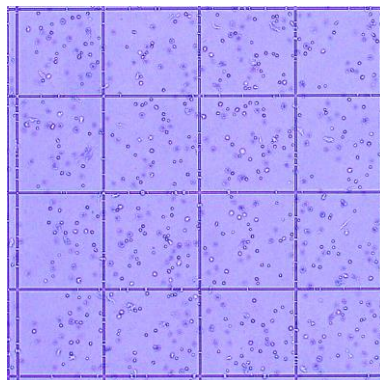


图 4-1 台盼蓝染色图

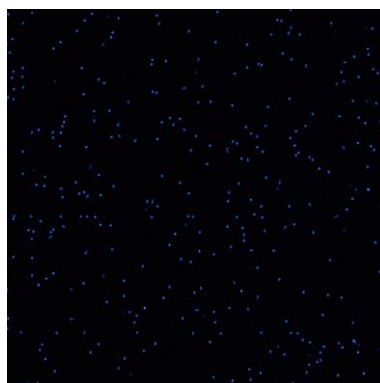


图 4-2 DAPI 染色图

4.9 常见问题及解决方案

表 4-4 常见问题及解决方案

常见问题	解决方案
细胞活率低	缩短消化时间
	优化消化方案
	使用去除死细胞试剂盒
背景碎片多	调整离心转速清洗
	使用小孔径细胞筛过滤
	流式细胞术筛选
细胞聚团	PBS 中加入适当浓度 BSA (推荐 0.04%)
	消化酶中加入少量 Dnase I

第五章 小鼠肾脏组织消化

5.1 概述

本章介绍了一种使用消化酶将新鲜的小鼠肾脏组织解离成单细胞悬液的推荐方案。如果要消化其他组织，可能需要对方案中某些条件进行修改（例如消化时间、消化酶种类、消化酶浓度等）。

5.2 注意事项

- ◆ 自组织离体起，消化过程需全程在超净工作台中进行且保持低温（烘箱除外）。
- ◆ 请按照材料供应商及当地实验室规范处理该方案所产生的生物废弃物。

5.3 组织描述

组织描述如下：

表 5-1 组织描述

组织来源	组织类型	组织大小
小鼠	肾脏	100~300 mm ³

5.4 试剂耗材

表 5-2 试剂耗材

品牌	物品名称	货号
Sigma	胶原酶通用型	C0130
Gibco	PBS	10010031
Sysmex	30 μm 细胞筛	04-004-2326
Corning	35 mm×10 mm 培养皿	CLS3294
Corning	15 mL 离心管	CLS430055
TIANGEN	红细胞裂解液	RT122
Biologix	3 mL 巴氏吸管	30-0138A1

5.5 试剂配制

表 5-3 试剂配制

试剂	配制方法	保存方法
10% 胶原酶通用型（4℃使用）	10 mL PBS 中加入 0.1 g 胶原酶通用型粉末	-25℃~-15℃

5.6 消化方案

- 1) 从解剖完成小鼠体内小心取出肾脏组织至培养皿中，培养皿置于冰上，全程保持低温，加2 mL 4℃预冷的PBS冲洗组织，洗去血污，弃去液体。
- 2) 重复洗涤一次。
- 3) 将冲洗干净组织放入新的培养皿中，培养皿置于冰上，加入2 mL 4℃预冷PBS至培养皿中，用干净

的解剖剪刀将组织充分剪碎，剪碎至 0.5 mm^3 左右。

- 4) 准备好15 mL 离心管，做好标记，用巴氏吸管将剪碎的组织连同PBS一同转移至15 mL 离心管，在培养皿中再加入1 mL 4°C 预冷PBS，冲洗重悬剩余组织，转移至离心管中，离心管中加 4°C 预冷PBS至4 mL，加入4 mL 10% 胶原酶通用型。
- 5) 加入完成后缓慢颠倒混匀，放入 37°C 烘箱中混匀仪上，转速设置为15 rpm，消化30 min。

 （根据对于细胞总量及活率的需求可自行调整消化时间。）

- 6) 消化结束后，取 $30\text{ }\mu\text{m}$ 细胞筛放入15 mL 离心管中，用1 mL 4°C 预冷PBS润洗，润洗完成后用巴氏吸管将管中所有样本过 $30\text{ }\mu\text{m}$ 细胞筛并收集液体；液体均通过 $30\text{ }\mu\text{m}$ 细胞筛后，用2 mL PBS冲洗解离用的离心管，过 $30\text{ }\mu\text{m}$ 细胞筛，收集得到细胞悬液。

 （若 $30\text{ }\mu\text{m}$ 细胞筛过滤困难，可先用 $70\text{ }\mu\text{m}$ 细胞筛，再使用 $30\text{ }\mu\text{m}$ 细胞筛。）

- 7) 设置离心机离心条件： 300 g ， 7 min ， 4°C 。离心，吸去上清，立即进行红细胞裂解。

5.7 红细胞裂解

- 1) 在细胞沉淀中加入3 mL 红细胞裂解液，扩口吸头吹打混匀，室温静置10 min。
- 2) 加入7 mL 4°C 预冷 PBS轻微颠倒混匀，离心机 300 g 7 min 4°C 离心，吸去上清。

 （若细胞沉淀中仍存在红细胞，重复上述步骤1）和2）。)

- 3) 加入3 mL PBS重悬细胞，台盼蓝染色测定细胞浓度和活率。

 （若活率低于70%，参照附录一死细胞去除方案进行死细胞去除操作。）

5.8 结果

小鼠肾脏组织消化后一般得到的细胞数为 $1 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$ 个，使用台盼蓝染色后计算细胞活率一般在80%~90%。

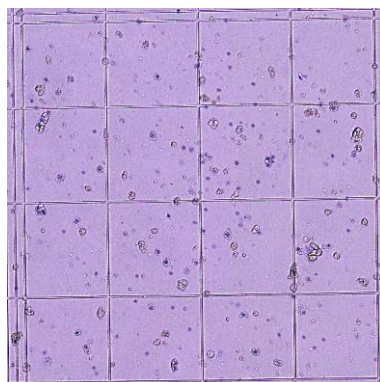


图 5-1 台盼蓝染色图



图 5-2 DAPI 染色图

5.9 常见问题及解决方案

表 5-4 常见问题及解决方案

常见问题	解决方案
细胞活率低	缩短消化时间
	优化消化方案
	使用去除死细胞试剂盒
背景碎片多	调整离心转速清洗
	使用小孔径细胞筛过滤
	流式细胞术筛选
细胞聚团	PBS 中加入适当浓度 BSA (推荐 0.04%)
	消化酶中加入少量 Dnase I

第六章 小鼠小肠组织消化

6.1 概述

本章介绍了一种使用消化酶将新鲜的小鼠小肠组织解离成单细胞悬液的可行方案。如果要消化其他组织，可能需要对方案中某些条件进行修改（例如消化时间、消化酶种类、消化酶浓度等）。

6.2 注意事项

- ◆ 自组织离体起，消化过程需全程在超净工作台中进行且保持低温（烘箱除外）。
- ◆ 请按照材料供应商及当地实验室规范处理该方案所产生的生物废弃物。

6.3 组织描述

组织描述如下：

表 6-1 组织描述

组织来源	组织类型	组织大小
小鼠	小肠	50~100 mm ³

6.4 试剂耗材

表 6-2 试剂耗材

品牌	物品名称	货号
Sangon	胶原酶I	A004194
Sangon	胰蛋白酶	A610629
Gibco	PBS	10010031
Sysmex	30 μ m 细胞筛	04-004-2326
Corning	35 mm×10 mm 培养皿	CLS3294
Corning	15 mL 离心管	CLS430055
TIANGEN	红细胞裂解液	RT122
Biologix	3 mL 巴氏吸管	30-0138A1

6.5 试剂配制

表 6-3 试剂配制

试剂	配制方法	保存方法
10% 胶原酶I（4℃使用）	10 mL PBS 中加入 0.1 g 胶原酶I粉末	-25℃~-15℃
10% 胰蛋白酶（4℃使用）	10 mL PBS 中加入 0.1 g 胰蛋白酶粉末	-25℃~-15℃

6.6 消化方案

- 1) 从解剖完成小鼠体内小心取出小肠组织至培养皿中，培养皿置于冰上，全程保持低温，加2 mL 4℃预冷的PBS冲洗组织，洗净小肠，弃去液体。

- 2) 重复洗涤一次。
- 3) 将冲洗干净组织放入新的培养皿中，培养皿置于冰上，加入2 mL 4℃预冷PBS至培养皿中，用干净的解剖剪刀将组织充分剪碎，剪碎至0.5 mm³左右。
- 4) 准备好15 mL 离心管，做好标记，用巴氏吸管将剪碎的组织连同PBS一同转移至15 mL 离心管，在培养皿中再加入1 mL 4℃预冷PBS，冲洗重悬剩余组织，转移至离心管中，离心管中加4℃预冷PBS至7 mL，加入1.5 mL 10% 胶原酶I和1.5mL 10% 胰蛋白酶。
- 5) 加入完成后缓慢颠倒混匀，放入37℃烘箱中混匀仪上，转速设置为15 rpm，消化30 min。

 (根据对于细胞总量及活率的需求可自行调整消化时间。)

- 6) 消化结束后，取30 μm细胞筛放入15 mL 离心管中，用1 mL 4℃预冷PBS润洗，润洗完成后用巴氏吸管将管中所有样本过30 μm细胞筛并收集液体；液体均通过30 μm细胞筛后，用2 mL PBS冲洗解离用的离心管，过30 μm细胞筛，收集得到细胞悬液。

 (若30 μm细胞筛过滤困难，可先用70 μm细胞筛，再使用30 μm细胞筛。)

- 7) 设置离心机离心条件：300 g，7 min，4℃。离心，吸去上清，立即进行红细胞裂解。

6.7 红细胞裂解

- 1) 在细胞沉淀中加入3 mL 红细胞裂解液，扩口吸头吹打混匀，室温静置10 min。
- 2) 加入7 mL 4℃预冷 PBS轻微颠倒混匀，离心机300 g 7 min 4℃离心，吸去上清。

 (若细胞沉淀中仍存在红细胞，重复上述步骤1)和2)。

- 3) 加入3 mL PBS重悬细胞，台盼蓝染色测定细胞浓度和活率。

 (若活率低于70%，参照附录一死细胞去除方案进行死细胞去除操作。)

6.8 结果

小鼠小肠组织消化后一般得到的细胞数为 $1 \times 10^6 \sim 2.5 \times 10^6$ 个，使用台盼蓝染色后计算细胞活率一般在70%~90%。

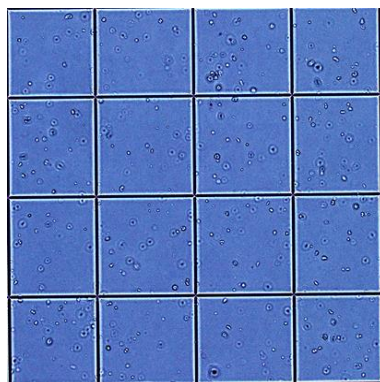


图 6-1 台盼蓝染色图



图 6-2 DAPI 染色图

6.9 常见问题及解决方案

表 6-4 常见问题及解决方案

常见问题	解决方案
细胞活率低	缩短消化时间
	优化消化方案
	使用去除死细胞试剂盒
背景碎片多	调整离心转速清洗
	使用小孔径细胞筛过滤
	流式细胞术筛选
细胞聚团	PBS 中加入适当浓度 BSA (推荐 0.04%)
	消化酶中加入少量 Dnase I

第七章 小鼠胃组织消化

7.1 概述

本章介绍了一种使用消化酶将新鲜的小鼠胃组织解离成单细胞悬液的推荐方案。如果要消化其他组织，可能需要对方案中某些条件进行修改（例如消化时间、消化酶种类、消化酶浓度等）。

7.2 注意事项

- ◆ 自组织离体起，消化过程需全程在超净工作台中进行且保持低温（烘箱除外）。
- ◆ 请按照材料供应商及当地实验室规范处理该方案所产生的生物废弃物。

7.3 组织描述

组织描述如下：

表 7-1 组织描述

组织来源	组织类型	组织大小
小鼠	胃	100~300 mm ³

7.4 试剂耗材

表 7-2 试剂耗材

品牌	物品名称	货号
Sigma	胶原酶II	C6885
Gibco	PBS	10010031
Sysmex	30 μm 细胞筛	04-004-2326
Corning	35 mm×10 mm 培养皿	CLS3294
Corning	15 mL 离心管	CLS430055
TIANGEN	红细胞裂解液	RT122
Biologix	3 mL 巴氏吸管	30-0138A1

7.5 试剂配制

表 7-3 试剂配制

试剂	配制方法	保存方法
10% 胶原酶II（4℃使用）	10 mL PBS 中加入 0.1 g 胶原酶II粉末	-25℃~-15℃

7.6 消化方案

- 1) 从解剖完成小鼠体内小心取出胃组织至培养皿中，培养皿置于冰上，全程保持低温，用干净的解剖剪刀小心剪开胃组织，加2 mL 4℃预冷的PBS冲洗组织，洗净胃组织，弃去液体。
- 2) 重复洗涤一次。
- 3) 将冲洗干净组织放入新的培养皿中，培养皿置于冰上，加入2 mL 4℃预冷PBS至培养皿中，用干净

的解剖剪刀将组织充分剪碎，剪碎至 0.5 mm^3 左右。

- 4) 准备好15 mL 离心管，做好标记，用巴氏吸管将剪碎的组织连同PBS一同转移至15 mL 离心管，在培养皿中再加入1 mL 4°C 预冷PBS，冲洗重悬剩余组织，转移至离心管中，离心管中加 4°C 预冷PBS至8 mL，加入2 mL 10% 胶原酶II。
- 5) 加入完成后缓慢颠倒混匀，放入 37°C 烘箱中混匀仪上，转速设置为15 rpm，消化30 min。

 （根据对于细胞总量及活率的需求可自行调整消化时间。）

- 6) 消化结束后，取 $30\text{ }\mu\text{m}$ 细胞筛放入15 mL 离心管中，用1 mL 4°C 预冷PBS润洗，润洗完成后用巴氏吸管将管中所有样本过 $30\text{ }\mu\text{m}$ 细胞筛并收集液体；液体均通过 $30\text{ }\mu\text{m}$ 细胞筛后，用2 mL PBS冲洗解离用的离心管，过 $30\text{ }\mu\text{m}$ 细胞筛，收集得到细胞悬液。

 （若 $30\text{ }\mu\text{m}$ 细胞筛过滤困难，可先用 $70\text{ }\mu\text{m}$ 细胞筛，再使用 $30\text{ }\mu\text{m}$ 细胞筛。）

- 7) 设置离心机离心条件： 300 g ， 7 min ， 4°C 。离心，吸去上清，立即进行红细胞裂解。

7.7 红细胞裂解

- 1) 在细胞沉淀中加入3 mL 红细胞裂解液，扩口吸头吹打混匀，室温静置10 min。
- 2) 加入7 mL 4°C 预冷 PBS轻微颠倒混匀，离心机 300 g 7 min 4°C 离心，吸去上清。

 （若细胞沉淀中仍存在红细胞，重复上述步骤1）和2）。)

- 3) 加入3 mL PBS重悬细胞，台盼蓝染色测定细胞浓度和活率。

 （若活率低于70%，参照附录一死细胞去除方案进行死细胞去除操作。）

7.8 结果

小鼠胃组织消化后一般得到的细胞数为 $0.5 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ 个，使用台盼蓝染色后计算细胞活率一般在70%~90%。

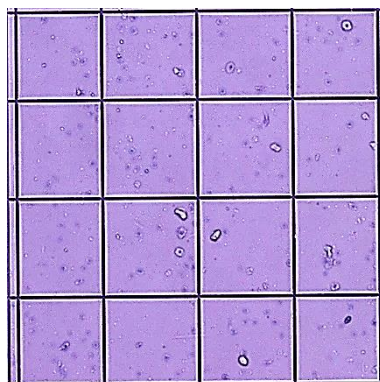


图 7-1 台盼蓝染色图

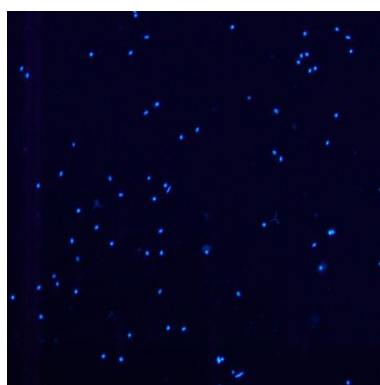


图 7-2 DAPI 染色图

7.9 常见问题及解决方案

表 7-4 常见问题及解决方案

常见问题	解决方案
细胞活率低	缩短消化时间
	优化消化方案
	使用去除死细胞试剂盒
背景碎片多	调整离心转速去除
	使用小孔径细胞筛过滤
	流式细胞术筛选
细胞聚团	PBS 中加入适当浓度 BSA (推荐 0.04%)
	消化酶中加入少量 Dnase I

第八章 人胃组织消化

8.1 概述

本章介绍了一种使用消化酶将新鲜的人胃组织解离成单细胞悬液的推荐方案。如果要消化其他组织，可能需要对方案中某些条件进行修改（例如消化时间、消化酶种类、消化酶浓度等）。

8.2 注意事项

- ◆ 自组织从保存液中取出起，消化过程需全程在超净工作台中进行且保持低温（烘箱除外）。
- ◆ 请按照材料供应商及当地实验室规范处理该方案所产生的生物废弃物。

8.3 组织描述

组织描述如下：

表 8-1 组织描述

组织来源	组织类型	组织大小
人	胃	100~300 mm ³

8.4 试剂耗材

表 8-2 试剂耗材

品牌	物品名称	货号
Sangon	胶原酶I	A004194
Gibco	PBS	10010031
Sysmex	30 μm 细胞筛	04-004-2326
Corning	35 mm×10 mm 培养皿	CLS3294
Corning	15 mL 离心管	CLS430055
TIANGEN	红细胞裂解液	RT122
Biologix	3 mL 巴氏吸管	30-0138A1

8.5 试剂配制

表 8-3 试剂配制

试剂	配制方法	保存方法
10% 胶原酶I（4℃使用）	10 mL PBS 中加入 0.1 g 胶原酶I粉末	-25℃~-15℃

8.6 消化方案

- 1) 从保存液中小心取出胃组织至培养皿中，培养皿置于冰上，全程保持低温，加2 mL 4℃预冷的PBS冲洗组织，洗去血污，弃去液体。
- 2) 重复洗涤一次。
- 3) 将冲洗干净的组织放入新的培养皿中，培养皿置于冰上，加入2 mL 4℃预冷PBS至培养皿中，用干

净的解剖剪刀将组织充分剪碎至 0.5 mm^3 左右。

- 4) 准备好15 mL 离心管，做好标记，用巴氏吸管将剪碎的组织连同PBS一同转移至15 mL 离心管；在培养皿中再加入1 mL 4℃预冷PBS，冲洗重悬剩余组织，转移至离心管中，离心管中加4℃预冷PBS至2 mL，加入4mL 10% 胶原酶I。
- 5) 加入完成后缓慢颠倒混匀，放入37℃烘箱中混匀仪上，转速设置为15 rpm，消化30 min。

 （根据对于细胞总量及活率的需求可自行调整消化时间。）

- 6) 消化结束后，取30 μm 细胞筛放入15 mL 离心管中，用1 mL 4℃预冷PBS润洗，润洗完成后用巴氏吸管将管中所有样本过30 μm 细胞筛并收集液体；液体均通过30 μm 细胞筛后，用2 mL PBS冲洗解离用的离心管，过30 μm 细胞筛，收集得到细胞悬液。

 （若30 μm 细胞筛过滤困难，可先用70 μm 细胞筛，再使用30 μm 细胞筛。）

- 7) 设置离心机离心条件：300 g，7 min，4℃。离心，吸去上清，立即进行红细胞裂解。

8.7 红细胞裂解

- 1) 在细胞沉淀中加入3 mL 红细胞裂解液，扩口吸头吹打混匀，室温静置10 min。
- 2) 加入7 mL 4℃预冷 PBS轻微颠倒混匀，离心机300 g 7 min 4℃离心，吸去上清。

 （若细胞沉淀中仍存在红细胞，重复上述步骤1）和2）。)

- 3) 加入3 mL PBS重悬细胞，台盼蓝染色测定细胞浓度和活率。

 （若活率低于70%，参照附录一死细胞去除方案进行死细胞去除操作。）

8.8 结果

人胃组织消化后一般得到的细胞数为 $0.5 \times 10^6 \sim 1.5 \times 10^6$ 个，使用台盼蓝染色后计算细胞活率一般在70%~85%。

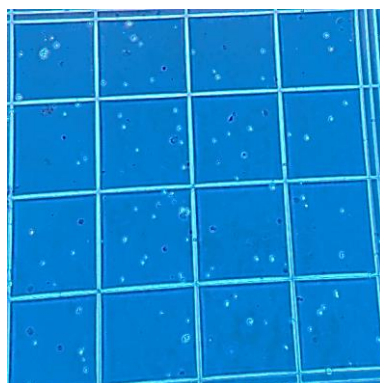


图 8-1 台盼蓝染色图

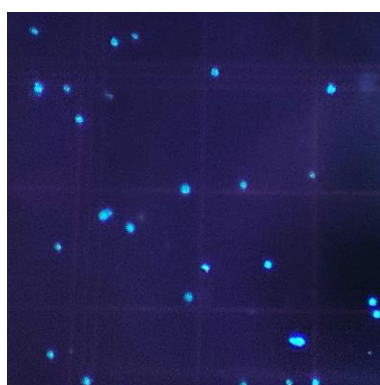


图 8-2 DAPI 染色图

8.9 常见问题及解决方案

表 8-4 常见问题及解决方案

常见问题	解决方案
细胞活率低	缩短消化时间
	优化消化方案
	使用去除死细胞试剂盒
背景碎片多	调整离心转速清洗
	使用小孔径细胞筛过滤
	流式细胞术筛选
细胞聚团	PBS 中加入适当浓度 BSA（推荐 0.04%）
	消化酶中加入少量 Dnase I

第九章 人胃癌组织消化

9.1 概述

本章介绍了一种使用消化酶将新鲜的人胃癌组织解离成单细胞悬液的推荐方案。如果要消化其他组织，可能需要对方案中某些条件进行修改（例如消化时间、消化酶种类、消化酶浓度等）。

9.2 注意事项

- ◆ 自组织从保存液中取出起，消化过程需全程在超净工作台中进行且保持低温（烘箱除外）。
- ◆ 请按照材料供应商及当地实验室规范处理该方案所产生的生物废弃物。

9.3 组织描述

组织描述如下：

表 9-1 组织描述

组织来源	组织类型	组织大小
人	胃癌	100~300 mm ³

9.4 试剂耗材

表 9-2 试剂耗材

品牌	物品名称	货号
Sangon	胶原酶I	A004194
Gibco	PBS	10010031
Sysmex	30 μm 细胞筛	04-004-2326
Corning	35 mm×10 mm 培养皿	CLS3294
Corning	15 mL 离心管	CLS430055
TIANGEN	红细胞裂解液	RT122
Biologix	3 mL 巴氏吸管	30-0138A1

9.5 试剂配制

表 9-3 试剂配制

试剂	配制方法	保存方法
10% 胶原酶I（4℃使用）	10 mL PBS 中加入 0.1 g 胶原酶I粉末	-25℃~-15℃

9.6 消化方案

- 1) 从保存液中小心取出胃癌组织至培养皿中，培养皿置于冰上，全程保持低温，加2 mL 4℃预冷的PBS冲洗组织，洗去血污，弃去液体。
- 2) 重复洗涤一次。
- 3) 将冲洗干净组织放入新的培养皿中，培养皿置于冰上，加入2 mL 4℃预冷PBS至培养皿中，用干净

的解剖剪刀将组织充分剪碎，剪碎至 0.5 mm^3 左右。

- 4) 准备好15 mL 离心管，做好标记，用巴氏吸管将剪碎的组织连同PBS一同转移至15 mL 离心管，在培养皿中再加入1 mL 4°C 预冷PBS，冲洗重悬剩余组织，转移至离心管中，离心管中加 4°C 预冷PBS至2 mL，加入4 mL 10% 胶原酶I。
- 5) 加入完成后缓慢颠倒混匀，放入 37°C 烘箱中混匀仪上，转速设置为15 rpm，消化30 min。

 （根据对于细胞总量及活率的需求可自行调整消化时间。）

- 6) 消化结束后，取 $30\text{ }\mu\text{m}$ 细胞筛放入15 mL 离心管中，用1 mL 4°C 预冷PBS润洗，润洗完成后用巴氏吸管将管中所有样本过 $30\text{ }\mu\text{m}$ 细胞筛并收集液体；液体均通过 $30\text{ }\mu\text{m}$ 细胞筛后，用2 mL PBS冲洗解离用的离心管，过 $30\text{ }\mu\text{m}$ 细胞筛，收集得到细胞悬液。

 （若 $30\text{ }\mu\text{m}$ 细胞筛过滤困难，可先用 $70\text{ }\mu\text{m}$ 细胞筛，再使用 $30\text{ }\mu\text{m}$ 细胞筛。）

- 7) 设置离心机离心条件： 300 g ， 7 min ， 4°C 。离心，吸去上清，立即进行红细胞裂解。

9.7 红细胞裂解

- 1) 在细胞沉淀中加入3 mL 红细胞裂解液，扩口吸头吹打混匀，室温静置10 min。
- 2) 加入7 mL 4°C 预冷 PBS轻微颠倒混匀，离心机 300 g 7 min 4°C 离心，吸去上清。

 （若细胞沉淀中仍存在红细胞，重复上述步骤1）和2）。)

- 3) 加入3 mL PBS重悬细胞，台盼蓝染色测定细胞浓度和活率。

 （若活率低于70%，参照附录一死细胞去除方案进行死细胞去除操作。）

9.8 结果

人胃癌组织消化后一般得到的细胞数为 $0.5 \times 10^6 \sim 1.5 \times 10^6$ 个，使用台盼蓝染色后计算细胞活率一般在70%~85%。

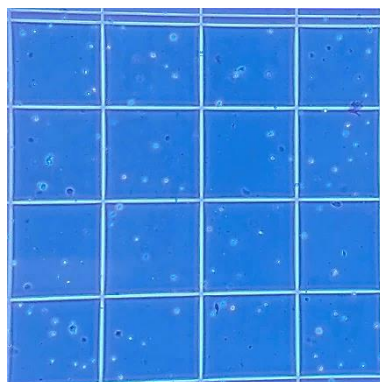


图 9-1 台盼蓝染色图

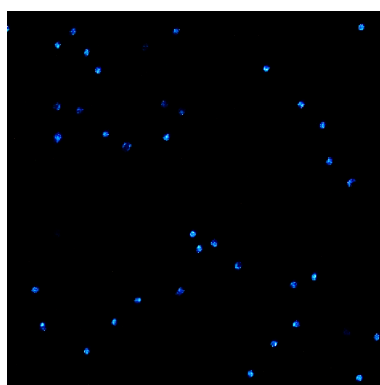


图 9-2 DAPI 染色图

9.9 常见问题及解决方案

表 9-4 常见问题及解决方案

常见问题	解决方案
细胞活率低	缩短消化时间
	优化消化方案
	使用去除死细胞试剂盒
背景碎片多	调整离心转速去除
	使用小孔径细胞筛过滤
	流式细胞术筛选
细胞聚团	PBS 中加入适当浓度 BSA (推荐 0.04%)
	消化酶中加入少量 Dnase I

第十章 人血液 PBMC 分离

10.1 概述

本章介绍了一种使用淋巴细胞分离液从新鲜的人全血中分离出PBMC单细胞的推荐方案，实际分离时可参考不同品牌淋巴细胞分离液操作指导书。

10.2 注意事项

- ◆ 分离过程需全程在超净工作台中进行且全血及淋巴细胞分离液保持 18℃~20℃。
- ◆ 请按照材料供应商及当地实验室规范处理该方案所产生的生物废弃物。

10.3 试剂耗材

表 10-1 试剂耗材

品牌	物品名称	货号
索莱宝	人外周血淋巴细胞分离液	P8610
Gibco	PBS	10010031
Sysmex	30 μ m 细胞筛	04-004-2326
Corning	15 mL 离心管	CLS430055
TIANGEN	红细胞裂解液	RT122
Biologix	3 mL 巴氏吸管	30-0138A1

10.4 分离方案

- 1) 准备好15 mL 离心管，做好标记，在15 mL 离心管中加入5~7 mL 血液，用等体积的PBS对血液进行稀释。
- 2) 准备好15 mL 离心管，做好标记，取30 μ m细胞筛放入15 mL 离心管中，用巴氏吸管将管中稀释后的样本过30 μ m细胞筛。
- 3) 准备好新的15 mL 离心管，做好标记，加入~7 mL 淋巴细胞分离液，将离心管倾斜 45°角，吸取稀释后的全血，在离分层液面上 1cm 处，沿离心管壁徐徐加入7~8 mL 稀释血液，使稀释血液叠于分层液上，保持两者界面清晰。

 **注意：**

[1]血样与分层液体积比例约为 1:1~2:1

[2]注意不要将淋巴细胞分离液与血液混合。

- 4) 离心机温度稳定在20℃后，离心机设置为400 g，离心30 min（离心机升降速设置为升3降0）。
- 5) 去掉上层血小板和血浆层，吸取白膜层即单核细胞层于新的15 mL 离心管中，加入3倍体积PBS，轻微颠倒混匀。

- 6) 离心机温度稳定20 °C后400 g, 离心10 min, 吸去上清, 加入6 mL PBS。
- 7) 设置离心机离心条件: 300 g, 7 min, 4°C。离心, 吸去上清, 立即进行红细胞裂解。

10.5 红细胞裂解

- 1) 在细胞沉淀中加入3 mL 红细胞裂解液, 扩口吸头吹打混匀, 室温静置10 min。
- 2) 加入7 mL 4°C预冷 PBS轻微颠倒混匀, 离心机离心条件设置为300 g, 7 min, 4°C。离心, 吸去上清。

 (若细胞沉淀中仍存在红细胞, 重复步骤 1) 和 2))。

- 3) 加入3 mL PBS重悬细胞, 台盼蓝染色测定细胞浓度和活率。

 (若活率低于 70%, 参照附录一死细胞去除方案进行死细胞去除操作。)

10.6 结果

人PBMC约5 mL 分离后一般得到的细胞数为 $3 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 个，使用台盼蓝染色后计算细胞活率一般在80%~100%。

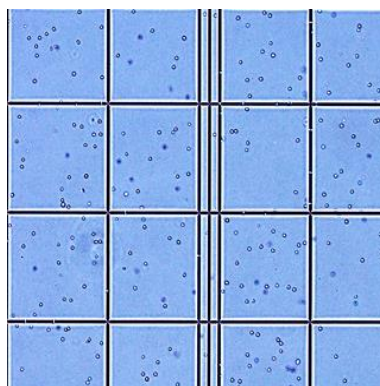


图 10-1 台盼蓝染色图



图 10-2 DAPI 染色图

10.7 常见问题及解决方案

表 10-2 常见问题及解决方案

常见问题	解决方案
存在大量红细胞	增加裂红次数
	确保离心机温度稳定在 20°C
	吸取单核细胞层时避免吸到其它层
存在大量粒细胞	低速离心去除

第十一章 液氮冻存组织细胞核制备

11.1 概述

本章介绍了一种使用研磨法从液氮冻存的组织中制备细胞核的推荐方案，已测试小鼠液氮冻存组织，处理其他物种组织时，可能需要对方案中的某些条件进行修改（例如研磨次数等）。

11.2 注意事项

- ◆ 自组织离开液氮起，处理过程需全程在超净工作台中进行且保持低温。
- ◆ 请按照材料供应商及当地实验室规范处理该方案所产生的生物废弃物。

11.3 组织描述

组织描述如下：

表 11-1 组织描述

组织来源	组织类型	组织大小
哺乳动物（例如小鼠、人）	肝、肺、肾等	100~500 mm ³

11.4 试剂耗材

表 11-2 试剂耗材

品牌	物品名称	货号
Gibco	PBS	10010031
Sysmex	30 μ m 细胞筛	04-004-2326
FALCON	70 μ m 细胞筛	352350
Corning	15 mL 离心管	CLS430055
Corning	35 mm×10 mm 培养皿	CLS3294
Sigma	Dounce 组织研磨套装	D8938
PALL	一次性针头滤器	4612
Sigma	Sucrose	V900116
BBI	100 mM DTT	01B022BM
Sigma	1 M KCl	60142
BBI	BSA	A600332-0100
Roche	NP40	11332473001
Roche	100 × Protease inhibitor cocktail	04693116001
BGI	RNase inhibitor	01E019MM
Invitrogen	1 M MgCl ₂	00813586
Invitrogen	1 M Tris pH 8.0	15568-025
Ambion	Nuclease-free water	AM9937

11.5 试剂配制

表 11-3 试剂配制

试剂名称	原料试剂	体积
NIM pH8.0 配制完成需用一次性针头 滤器过滤 (4°C保存 15 天)	1 M Tris pH 8.0	0.5 mL
	Sucrose	4.3 g
	1 M KCl	1.25 mL
	1 M MgCl ₂	0.25 mL
	Nuclease-free water (NF water)	48.0 mL
Homogenization Buffer (现配现用, 每个组织 2 mL)	NIM pH 8.0	2172.5 µL
	100 mM DTT	2.5 µL
	100 × Protease inhibitor cocktail	25.0 µL
	RNase inhibitor (40 U/µl)	25.0 µL
	10% BSA	250.0 µL
	10% NP40	25.0 µL
Blocking Buffer (现配现用, 每个组织 3 mL)	1 × PBS	3132.5 µL
	10% BSA	350.0 µL
	RNase inhibitor (40 U/µl)	17.5µL

11.6 处理方案

- 1) 取培养皿置于冰上, 全程保持低温并加入2 mL 4°C预冷后的Homogenization Buffer(HB)。组织从液氮中取出, 直接转移组织块至培养皿中。
- 2) 静置5~10 min, 待组织充分浸润。用干净的解剖剪刀将组织充分剪碎, 剪碎至0.5 mm³左右, 转移至研磨器中。
- 3) 研磨棒使用前需充分清洗以去除DNA和RNase, 研磨前需用NF Water洗净并晾干。研磨棒A研磨组织块, 直到阻力消失(约10~15次)。使用70 µm细胞筛过滤组织研磨后液体, 并收集。
- 4) 用2 mL NF Water清洗研磨器内部, 去除残余组织, 弃掉液体。
- 5) 将收集的组织研磨液加入清洗后的研磨器, 用研磨棒B研磨10次左右。使用30 µm细胞筛过滤组织研磨后的液体到15 mL 离心管中。
- 6) 设置离心机离心条件: 500 g, 5 min, 4°C。离心, 弃上清。
- 7) 用1.5 mL Blocking Buffer重悬沉淀, 离心机500 g, 5 min, 4°C。离心, 弃上清。
- 8) 重复步骤7) 一次。
- 9) 用1 mL PBS重悬细胞核, 扩口吸头吹打混匀。

10)用DAPI对细胞核进行染色和计数。

11.7 结果

液氮冻存组织处理后一般得到的细胞核数为 $1 \times 10^7 \sim 2 \times 10^7$ 个。使用DAPI染色后，计算细胞聚团率一般在3%~7%。

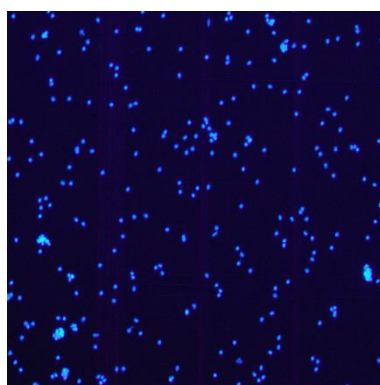


图 11-1 DAPI 染色图

11.8 常见问题及解决方案

表 11-4 常见问题及解决方案

常见问题	解决方案
细胞核聚团	过更小孔径的细胞筛 减少研磨次数

附录

附录 A 死细胞去除方案

A-1 概述

本文将提供美天旎去死细胞试剂盒基本操作流程，具体可参考美天旎官网Dead Cell Removal Kit 使用流程。

A-2 试剂耗材

表 A-1 试剂耗材

品牌	物品名称	货号
Miltenyi	Dead Cell Removal Kit	130-090-101
Miltenyi	Mini & MidiMACS™ Starting Kits	130-042-501
Gibco	PBS	10010031
Corning	15 mL 离心管	CLS430055

A-3 死细胞去除柱子选用

表 A-2 耗材选用

柱子类型	货号	死细胞去除上限	总细胞加载上限
MS Columns	130-042-201	10^7 个	2×10^8 个
LS Columns	130-042-401	10^8 个	2×10^9 个

A-4 处理方案

- 1) 提前取出Dead Cell Removal Kit，根据用量，用NF water将试剂盒里的20x Binding Buffer Stock Solution稀释成1x Binding Buffer。例如1 mL 20x Binding Buffer Stock Solution，加19 mL 的NF water。
- 2) 将细胞悬液转移至15 mL 离心管中，补PBS至10 mL。将15 mL 离心管置于吊篮离心机离心。离心条件设置：500 g，5 min，4℃；离心，弃上清。
- 3) 吸取100 μ L Dead Cell Removal MicroBeads重悬细胞沉淀，室温孵育15 min。

 (100 μ L Dead Cell Removal MicroBeads 去除死细胞的上限为 10^7 个。)

- 4) 根据表S2选取合适的柱子类型及对应的Separator。将Columns置于相应Separator上。
- 5) 室温孵育15 min快结束时，向Columns 中加以下括号中对应体积的 1xBinding Buffer润洗Column，待液体流尽后，用新的15 mL 离心管承接以下步骤里的液体。

 (MS Columns: 500 μ L; LS Columns: 3 mL)

- 6) 将带有磁珠的细胞悬液加到Columns上并收集液体。

7) 待柱子中液面不可见时，加入以下括号里推荐体积的1×Binding Buffer，收集液体；共重复四次。

 (MS Columns: 500 μ L*4; LS Columns: 3 mL*4)

8) 待柱子中无液滴滴下后，取收集管置于离心机，设置离心条件：500 g， 5 min， 4℃。离心，弃上清。

9) 加入2~3 mL PBS重悬细胞，台盼蓝染色测定细胞浓度和活率。

A-5 常见问题及解决方案

表 A-3 常见问题及解决方案

常见问题	解决方案
MS 柱子堵塞	去死细胞前进行过滤以减少细胞中杂质 更换 LS 柱子

附录 B 其他组织消化条件

表 B-1 组织消化条件

组织类型	消化酶	消化时间
人-肝癌	0.25% 胰蛋白酶	1 h
人-胶质瘤	0.25% 胰蛋白酶	30 min
人-乳腺癌	0.25% 胰蛋白酶+0.3% 胶原酶II	2 h
人-卵巢癌	0.3% 胶原酶II	1 h
人-结直肠癌	0.25% 胰蛋白酶	2 h
人-口咽癌	0.3% 胶原酶I	1 h
人-口腔鳞癌	0.3% 胶原酶I	2 h
人-宫颈癌	0.3% 胶原酶II	2 h
人-胰腺癌	0.3% 胶原酶II	2 h
人-听神经瘤	0.25% 胰蛋白酶	2 h
人-在位内膜	0.3% 胶原酶II	1 h
人-胎盘	0.25% 胰蛋白酶	2 h
人-蜕膜	0.3% 胶原酶I	30 min
人-子宫内膜	0.3% 胶原酶II	1 h
人-皮肤	0.25% 胰蛋白酶	3 h
人-食管	0.3% 胶原酶I	1 h
人-足底	0.3% 胶原酶II	1 h
人-肌肉	0.3% 胶原酶II	1 h
人-甲状旁腺	0.25% 胰蛋白酶	1 h
人-脂肪	0.3% 胶原酶I	1 h

表 B-2 组织消化条件

组织类型	消化酶	消化时间
小鼠-脑皮层	0.25% 胰蛋白酶	1 h
小鼠-海马体	0.25% 胰蛋白酶	40 min
小鼠-脑皮质	0.25% 胰蛋白酶	1 h
小鼠-肠系膜	0.3% 胶原酶I	1 h
小鼠-胰腺	0.3% 胶原酶II	1 h
小鼠-淋巴结	0.25% 胰蛋白酶	1 h
小鼠-背根神经节	0.25% 胰蛋白酶+0.3% 胶原酶I	1.5 h
小鼠-脂肪	0.25% 胰蛋白酶	1 h
小鼠-皮肤	0.25% 胰蛋白酶	50 min
大鼠-大脑皮层	0.25% 胰蛋白酶	1 h
大鼠-胎鼠	0.25% 胰蛋白酶	20 min
大鼠-颈动脉	0.25% 胰蛋白酶	3 h
大鼠-肾脏	0.25% 胰蛋白酶	2 h
大鼠-肺	0.25% 胰蛋白酶	2 h
大鼠-心脏	0.3% 胶原酶II	2 h
猪-心脏	0.3% 胶原酶II	2 h
猪-肠道	0.25% 胰蛋白酶	30 min
鸡-肌肉	0.25% 胰蛋白酶	1 h

 注意：上述组织单细胞解离条件来自于文章资料，仅供参考。

联系我们

生产企业：深圳华大智造科技股份有限公司

生产地址：深圳市盐田区北山工业区综合楼及 11 栋 2 楼

客服电话：4000-966-988

技术支持：MGI-service@mgi-tech.com

网 址：www.mgi-tech.com



官方微信