

SeekMate 组织解离试剂盒A Pro说明书

【产品名称】

SeekMate 组织解离试剂盒A Pro

【包装规格】

8 测试/盒；30 测试/盒

【预期用途】

本品用于人体或鼠体外组织的解离，目前仅用于科研不用于回输治疗。

【检验原理】

组织中的细胞外基质与细胞之间的连接，由一系列不同的蛋白质和其它生物成分组成；通过特定的蛋白酶组合，可以消化细胞外基质与细胞、细胞与细胞之间的连接，从而达到组织解离的目的。

【主要组成成分】

各酶组分以溶液状态存在，规格如下：

子系列	组分	8 测试/盒	30 测试/盒*
A Pro	酶H	290 μ L	1080 μ L
	酶A	210 μ L	780 μ L
	酶R	345 μ L	1300 μ L

*30 测试包装试剂建议第一次融化后分装成 2-3 次用量（可以根据酶的单反应使用量来进行计算）单独保存，避免多次反复冻融

*一次反应A Pro（3 mL，0-150 mg组织推荐用量）需要酶量分别为：30 μ L酶 H、36 μ L酶 R、21.6 μ L酶 A

【储运条件和有效期】

未开封试剂盒于-20 \pm 5 $^{\circ}$ C 储存，有效期为 12 个月。

运输条件：干冰运输。

【样本要求】

1. 适用样本类型：

试剂盒适用于人或小鼠肝脏、肺组织、小鼠肿瘤组织以及人肿瘤样本（不适用于脑肿瘤）；

2. 样本收集注意事项：

- 2.1. 在取样时（尤其是病变组织）尽量避免取到坏死、钙化、硬化、纤维化的部位；
- 2.2. 如手术为电刀切割组织，去除因与电刀接触的坏死组织；
- 2.3. 确保目标组织术时无冰冻；
- 2.4. 在取样后可对组织进行修剪，尽可能快速去除非目标部位，然后尽快放入组织保存液中，以免影响最终测序结果；
- 2.5. 如是高龄动物标本，请尽快送实验室进行解离；
- 2.6. 提前考虑实验模型，是否会对细胞有影响；如小鼠肺部打入二氧化硅颗粒后，二氧化硅密度和细胞类似，后续无法去除干净；

2.7. 提前考虑药物治疗，是否会对细胞有影响，如肿瘤治疗后，大部分肿瘤细胞凋亡后形成的碎片不易与细胞区分，影响细胞质检有核率。

3. 样本储存

切取适当组织，用PBS或生理盐水洗掉组织中的血液，将洗后的组织放入加满组织保存液的1 mL（或者更大）保存管中。储存时间不超过48 h。

4. 样本运输

保存于组织保存液中组织样本的运输方式为冰袋运输。

【使用方法】

1. 解离操作过程

1.1. 试剂准备：a.取出适合组织用的单管解离酶冰上融化备用；

b.配置50 mL细胞重悬buffer冰上备用：1640+2%FBS；

按组织大小配制解离液：

组织大小	0-150 mg组织 推荐用量 3 mL	150-300 mg组织 推荐用量 5 mL
酶 H	30 μ L	50 μ L
酶 R	36 μ L	60 μ L
酶 A	21.6 μ L	36 μ L
1640+2%FBS溶液	2.92 mL	4.86 mL

1.2. 组织制备：在六孔板中加入1× PBS 溶液，组织从组织保存液中取出置于其中清洗，洗掉残留血液、粘液，取适量清洗后的样本加入解离液中，**用手术剪将组织切成1 mm³左右的组织块；**

注1：六孔板中剪成绿豆粒大小清洗掉内部血液粘液；穿刺活检样本直接离心保存液管不做清洗，减少清洗损失，药物治疗后或者脆弱造模的组织可以使用细胞重悬buffer清洗。

注2：可以将200 μ L的解离液加入1.5 mL的离心管中，将样品剪碎后转移到较大的消化管中。

1.3. 将带有组织的解离液放置于杂交炉或水浴锅中，37℃孵育 15-40 min，以组织解离完全为最佳，**每隔10 min用宽口枪头混匀解离液，有大块组织可以再次用剪刀剪碎；**

注：脆弱样本或新测试的组织类型，每10 min的混匀后进行AO/PI质检，对细胞进行计数监测。如果组织未解离完全、出现细胞活率大幅度下降时终止孵育，可能解离液浓度方案需要调整。

1.4. 解离完全后，轻柔混匀解离液，使用40-70 μ m无菌细胞筛过滤；

注：筛网使用前用细胞重悬buffer润洗细胞筛，此步过滤建议先使用70 μ m细胞筛，减少损失，较粘解离液的样本，先用重悬buffer稀释解离液再进行过滤。

1.5. 使用5 mL 1640+2%FBS冲洗细胞筛；

1.6. 将过滤后的细胞悬液混匀离心，4℃下300 g，5 min；去上清；

注：细胞量<5万，建议使用400 g离心。

1.7. 取1 mL 1640+2%FBS 重悬细胞沉淀；混匀后取10 μ L悬液进行AO/PI染色，对细胞进行计数监测；

注：重悬浓度建议700-1200个细胞/ μ L，根据预计浓度调整重悬体积。

1.8. 红细胞裂解：在细胞悬液中加入3倍体积的红细胞裂解液，颠倒混匀后室温孵育2-5 min；等体积的1640+2%FBS 溶液中中止红细胞裂解；

注：其他品牌裂红液按配套出厂sop使用操作。

1.9. 颠倒混匀后，4℃下300 g，5 min；去上清；

注：细胞量<5万，建议使用400 g离心；1.7步还有细胞团块或者杂质可以离心前先使用40 μm细胞筛过滤。

1.10. 取1 mL 1640+2%FBS重悬细胞沉淀；混匀后取10 μL悬液进行AO/PI染色，对细胞进行计数监测；

注：重悬浓度建议700-1200个细胞/μL，根据预计浓度调整重悬体积。

1.11. 如细胞检测合格，细胞暂存于冰上或4℃，可安排后续实验。如细胞中碎片较多，需进行优化处理，检测合格后安排后续实验。

质检标准（单细胞测序为例）：细胞活率>90%；细胞结团率<10%；有核率（有核细胞比例）>70%；活细胞浓度范围：700~1200 cells/μL；细胞的直径范围：5~40 μm。

【正判断价值或参考区间】

本试剂盒是一种样品处理试剂盒。加工后的纯化产品用于其他体外诊断试验。试剂盒本身没有正的判断值或参考区间。

【测试结果优化解释及方案】

1. 原因解释

解离效果与样本质量及其本身属性关联性较强，样本质量差、坏死组织无法分离或者内源性蛋白酶较多，均会导致解离出单细胞悬液质量较差，碎片较多，无法满足后续操作要求，实验失败等情况的发生。对于样本本身质量差的样本，尽量挑选合适部位进行实验操作；如出现碎片较多、有核率低及活率低等情况，可根据情况选择性尝试去碎片、去死细胞、过筛等操作，推荐耗材详见附件表格。

2. 优化方案

2.1. 活性偏低（活率<80%）：

推荐使用流式或美天旎去死细胞试剂盒分选，优化操作建议取活细胞量50万（细胞量不足50万时，最低取10万），保证后续实验需求，常见于坏死、损伤模型组织或药物治疗后的肿瘤。80-85%活率可以使用4 mL 1640+10%FBS重悬混匀细胞悬液再次离心清洗一次；

2.2. 有核率低（有核率<55%）：

推荐使用流式或美天旎去碎片试剂盒优化，优化操作建议取活细胞量50万（细胞量不足50万时，最低取10万），保证后续实验需求，常见如肝、成年心脏、脑这类有大直径的功能细胞组织需要此优化（此类组织建议配备美天旎去碎片试剂）。药物治疗坏死样本可以使用percoll密度梯度离心法分离杂质。

2.3. 结团偏高（>20%）：

原代组织解离结团率大多在10-20%，此区间如满足实验需求可不再进行优化，不满足需求可使用20-40 μm小细胞筛再次过滤（Flowmi Cell Strainers, BAH136800040, Sigma-Aldrich此产品效果较好）。

【检验方法的局限性】

1. 本试剂盒为样品处理试剂盒，解离后的产品应用于其他体外诊断试验，而不是直接作为体外诊断试验的结果使用。
2. 本试剂盒的操作人员应具有一定的分子生物学理论知识和操作技能，只有经过培训和合格后才能操作本试剂盒。
3. 本试剂盒仅适用于【样本要求】中标注的样本类型。

【注意事项】

1. 使用前请仔细阅读产品说明书，并严格按照说明书要求操作。

2. 试剂开瓶后，应按规定的贮存条件保存，并在有效期内使用，试剂过期后，不建议使用。
3. 如单次使用组织大于1 G或者有使用配套解离仪器的需求，建议在原有基础上按照每100 mg增加1 ml组织解离液的标准增加解离液用量。
4. 有效期内，如在融化过程中，发现解离液出现白色沉淀，混合后不影响正常使用。
5. 产品用完后废弃物按照相关医疗垃圾进行处理。

【附件：三方耗材推荐明细】

细胞悬液制备					
常用试剂					
温度	试剂名称	货号	品牌	规格/型号	用途/要求
常温	Nuclease-Free Water (not DEPC-Treated)	4387936	Invitrogen	/	
	1X PBS 缓冲液	SH30256.LS	HyClone	6 x 1000 mL	无钙镁离子
4°C	RPMI 1640 Medium	11875093	Gibco	500 mL	推荐使用
	新鲜组织保存液	/	寻因生物	/	也可用美天旎
	MACS BSA Stock Solution	130-091-376	Miltenyi	/	细胞保护剂
	AO/PI细胞染色液	K01701	寻因生物	5 mL	荧光细胞计数染料
	红细胞裂解液	R1010-500mL	Solarbio	500 mL	组织解离必备
	Dead Cell Removal Kit	130-090-101	Miltenyi	for 1×10 ⁹ total cells	去死细胞, 可预备
	Debris Removal Solution	130-109-398	Miltenyi	2×45 mL	去碎片, 可预备
-20°C	FBS	10100147C	gibco	500 mL	细胞保护剂
	Trypsin胰蛋白酶0.25%	SH30042.01	Hyclone	100 mL	对高结团细胞再次消化
常用仪器					
仪器名称		用途/要求			
低温水平离心机		实验必备仪器, 用于15/50 mL离心管离心, 推荐使用赛默飞公司			
细胞计数仪(AO/PI)		推荐使用荧光细胞计数仪			
显微镜		要有10/20//40倍镜, 用于辅助细胞质控			
漩涡混合器		震混试剂, 无其他要求			
复合掌上离心机		可离心0.2/1.5 mL 的离心管			
制冰机		无特殊要求			
常用耗材					
耗材名称	货号	品牌	规格/型号	用途	
MS Separation columns	130-042-201	Miltenyi	25 columns	去死细胞分选柱	
MACS SmartStrainer	130-098-462	Miltenyi	70 μm	细胞过滤	
MACS Separator	/	Miltenyi	/	分选磁铁	
Falcon细胞过滤	352340	Corning	40 μm	细胞过滤	
Flowmi Cell Strainers	BAH136800040	Sigma-Aldrich	40 μm	可配备, 细胞过滤	
通用耗材					
耗材名称	货号	品牌	规格/型号	要求	
离心管	430790	Corning	15 mL	无菌无酶	
离心管	430828	Corning	50 mL		
细胞培养板	CLS3516	Corning	6孔		
DNA LoBind Tub	22431021	Eppendorf	1.5 mL	无菌无酶、低吸附	
DNA LoBind Tub	22431048	Eppendorf	2.0 mL		
Tubes (带锁扣盖)	30119487	Eppendorf	5.0 mL		
75%医用酒精	/	/	500 mL		
剪刀镊子	/	/	/		