

## 细胞悬液制备试剂盒（组织消化试剂盒）

产品货号：26691

产品规格：100mL

### 产品简介：

本试剂盒应用蛋白酶的消化作用和非酶的化学作用使组织中细胞间的桥连结构松动，使团块膨松，由块状变成絮状，再采用机械法，用吸管吹打分散或电磁搅拌或在摇珠瓶中振荡，使细胞团块得以较充分的分散，制成少量细胞群团和大量单个细胞的细胞悬液。制备的细胞悬液可用于原代培养、流式细胞仪进行细胞生物学（如凋亡、增殖、细胞周期等）研究、细胞胞内酶学测定、信号传递分子、代谢、蛋白或DNA提取、Western Blot、2D-胶、ELISA、蛋白质组学等研究。

适用范围：各种动物组织，从中分离各种细胞，包括肝细胞、心肌细胞、神经和内皮细胞、软骨细胞、脂肪细胞、成纤维细胞、青蛙卵母细胞、胰岛、肿瘤细胞以及其它细胞。

### 产品组成：

产品组成	100mL	保存条件
漂洗液	100mL	2-8°C
消化酶 A（100 mg/mL）	500 $\mu$ L	-20°C
稀释液	100mL	2-8°C
消化酶B	100mL	-20°C
清洗液	100mL	2-8°C

注：所有组分均过滤除菌，请注意无菌操作。

### 注意事项：

1. 组织取材需新鲜、无菌、操作轻柔，防止机械损伤。尽量去除无用组织、避免干燥。
2. 充分漂洗去除血清及离子，以避免其影响消化酶的活性。
3. 消化酶不宜浓度过高、时间过长，避免对细胞产生毒性反应及消化产生多种杂质细胞。
4. 消化后尽量去除消化液，以防止毒性作用，并且动作要轻，以避免膨松的细胞随漂洗而丢失。
5. 部分分离的细胞如需进一步培养，请参照相关文献的细胞培养条件。
6. 如果消化不完全或细胞被损伤，应根据情况相应调整消化液的浓度、消化时间或消化温度，除表1（见下页）推荐的消化条件之外，亦可参考表2及表3（见下页）来建立适合各自样本的消化条件。

### 操作步骤

#### I. 组织直接消化法：

1. 无菌的解剖剪将实体组织剪成2-3mm<sup>3</sup>小块（至少0.5~1cm<sup>3</sup>）或糊糜状。
2. 加入适量漂洗液漂洗三次，每次尽量除去漂洗液。
3. 用稀释液稀释消化酶A，配制成一定浓度的消化酶A工作液。
4. 在组织中加入适量的消化酶A工作液消化，加入量以组织块完全没入为宜，37°C，消化若干分钟至数小时。  
（注：不同组织或细胞类型所用消化酶A工作液浓度、消化时间及温度均不尽相同，请参考表1）
5. 选作步骤：对于较难消化的硬组织或上述消化液A过滤后的残块可进行二次消化或多次消化，每次加入与消化酶A工作液等体积的消化液B，37°C，消化20-60min；
6. 静置后小心弃去消化液上清，轻轻加入少许清洗液（可加入0.25%小牛血清）漂洗三次；



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

7. 机械分散,用吸管吹打或电磁搅拌或在摇珠瓶中振荡,使组织分散,用100~200目不锈钢网或铜网或尼龙网(细胞筛)研磨过滤;
8. 吸上述滤液,1500mg/mL离心2min,弃上清。沉积细胞加入适量清洗液同样清洗、离心三次;
9. 沉淀加入适宜的培养液,轻轻吹打制成细胞悬液,显微镜计数后,进行进一步接种培养或其它研究。

表1不同组织使用消化酶A的参考浓度及消化条件

细胞类型	组织	物种	消化酶A工作液浓度	消化条件
脂肪细胞	脂肪组织	人	1-3mg/mL	37°C, 30min
心肌细胞	心脏	人	8-10mg/mL	37°C, 2-3.5h
软骨细胞	软骨	人	3.6mg/mL	37°C, 16h
内皮细胞	脐带	人	1.2mg/mL	37°C, 20-40min
平滑肌细胞	血管平滑肌	人	0.8mg/mL	37°C, 2-3h
成纤维细胞(皮肤)	包皮	人	4.5mg/mL	3g皮肤5min
胰岛	胰腺	人	每克组织200mg	37°C, 25-30min
间质细胞	脐带	人	2.4mg/mL	37°C, 19h
甲状腺	甲状腺组织	人	8-10mg/mL	37°C, 6-7h
肿瘤细胞	癌组织	人	8-10mg/mL	37°C, 2-4h
心肌细胞	心脏	大鼠	5mg/mL	30 min, 加透明质酸酶
上皮细胞	乳腺	小鼠	3.4mg/mL	室温, 15-25min
成纤维细胞	皮肤	小鼠	4.8mg/mL	37°C, 12-20h
神经节细胞	背根	新生大鼠	1.9mg/mL	25°C, 25min
肝细胞	肝脏	小鼠	1.2mg/mL	37°C, 灌注
胰岛	胰腺	大鼠	3mg/mL	
神经元	海马	大鼠	2.8mg/mL	25°C, 25min
关节软骨细胞	软骨	牛	3mg/mL	37°C, 15-45min
软骨细胞	半月板	牛	3mg/mL	37°C, 15-45min
肝细胞	肝脏	猪或狗	1350mg/分离	
卵细胞	卵巢	非洲蟾蜍	3-5mg/mL	室温2-3h

表2消化酶A和B的特征比较

项目	消化酶A	消化酶B
消化特性	纤维多的硬组织	适用于消化软组织
用量	1-3mg/mL	0.25%
消化时间	1-12h	0.5-2h
pH	6.5-7.0	8-9
作用强度	缓和	强烈
对细胞影响	无大影响	时间过长有影响
血清、钙、镁离子	无影响	有影响

表3消化酶A和B的对不同温度下消化组织小块(0.5-1cm<sup>3</sup>)所需用的时间(h)

	较硬组织			软组织		
	4°C	室温	37°C	4°C	室温	37°C
消化酶A(2mg/mL)	24	6	65	12	3	0.25
消化酶B	12-48	1-6	1-2	12-24	1-2	0.5-1
混合酶(1:1)	12-46	12-24	4-12	12-24	6-12	1-2



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址:郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com

## II. 灌注消化方法（仅供参考）

除上述直接消化法之外，某些组织（肝、内皮、心肌等）可采用下述灌注消化方法：

### 1. 肝细胞

实验动物以乙醚麻醉，无菌操作下开腹，暴露门静脉与下腔静脉，行门静脉穿刺，用预温37°C的漂洗液进行原位灌注。待肝脏充盈后剪开下腔静脉，放尽积血积液后用血管钳关闭血管。如此反复灌注20min，至肝脏表面湿润变软、呈现黄白色时停止，用消化酶A工作液（终浓度3mg/mL）灌注保留10-20min，取下肝脏置培养皿中，剪成乳糜状，37°C消化30min，用适量的清洗液（可事先加入0.25%的小牛血清）清洗后，200目滤网研磨过滤，吸取滤液，500mg/mL离心2min，弃上清。沉积的细胞再以同样条件清洗、离心2~3次。最后用RPMI-1640制成细胞悬液备用。

### 2. 内皮细胞

内皮细胞易于从大血管分离培养成单层细胞，研究人内皮细胞培养以人脐带静脉灌注消化法最为简便。产后新鲜脐带，无菌剪取10-15cm，用三通注射器吸取温漂洗液，注入脐静脉中洗去残血，在入口处用线绳扎紧，以防液体返流。用血管钳夹紧脐带一端，从另一端向脐静脉中徐徐注入消化酶A工作液（终浓度为5mg/mL），充满血管，消化3-10min；注入口用线绳扎，以防液体返流。吸出含有内皮细胞的消化液，于离心管中，注入温清洗液轻轻反复冲洗后，一并注入离心管中（此步骤可重复）。离心去上清，加培养液制成细胞悬液，接种培养。

### 3. 心肌细胞

大鼠常规方法开胸，行胸主动脉插管，Langendorff离体心脏灌注装置用漂洗液逆灌，恒温37°C灌注10-15min直至心脏停跳，用消化酶A工作液（终浓度5mg/mL）灌注约20min，停灌后剪下左右心室，剪成1.5mm<sup>3</sup>左右的小块，置于细胞分离钢网筛（60目）研磨过滤，滤液离心（700mg/mL离心1min，沉淀用清洗液与适当培养液（3:1）的混合液离心洗涤4-5次，悬液再悬浮于3%-6% BSA上梯度离心（700mg/mL离心1min，二次），沉淀含有10%小牛血清的培养液重悬，接种培养。

**保存条件：** -20°C，12个月。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com