

## gentleMACS™ 操作步骤

### 1. 背景信息

在许多实验中，需要用到单细胞悬液，如用MACS®技术分选细胞时，要想获得高纯度和回收率的话，单细胞悬液就很重要。德国美天旎生物技术有限公司开发的gentleMACS™ 分离器能够提供优化的程序，用于从不同的组织中获取单细胞悬液。这些组织包括小鼠脾脏，肝脏，肺脏，脑组织等。使用C管，能够在一個密闭的系统中进行全自动的组织分离，可以保证组织操作的无菌，以及能够同时处理2个组织样本。



### 2. 分离小鼠脾脏的操作步骤

#### 2.1 需要的试剂和仪器

- gentleMACS 分离器
- gentleMACS C 管 (# 130-093-237)
- 细胞滤器, 如30  $\mu$ m 尼龙滤网 ( Pre-Separation Filters# 130-041-407)
- 缓冲液: PBS缓冲液, pH 7.2,含 0.5% 牛血清白蛋白 (BSA), 和2 mM EDTA (不推荐使用含Ca<sup>2+</sup> or Mg<sup>2+</sup>的缓冲液)

## 2.2 步骤

▲ 如制备的单细胞悬液用于细胞培养, 所有的步骤必须在无菌条件下获得。

▲ 一只小鼠脾脏的重量约为 80 - 120 mg (BALB母鼠, 6 - 7 周龄).

1. 将小鼠脾脏转移到gentleMACS C 管中, 按照脾脏的数量加入缓冲液:

1 - 2 个小鼠脾脏: 3 mL

3 - 4个小鼠脾脏: 6 mL

5 - 6 个小鼠脾脏: 9 mL

2. 拧紧C管盖子, 倒置在gentleMACS 分离器上

▲ 注意: 必须确保组织块在转子区域

3. 开机, 选择合适的分离程序:

1 - 2 个小鼠脾脏: m\_spleen\_01.

3 - 6个小鼠脾脏: m\_spleen\_04.

4. 运行 gentleMACS 程序 m\_spleen\_01. 或 m\_spleen\_04.

5. 程序结束后, 从gentleMACS 分离器中取出C管

6. (可选) 以 300×g 室温下离心2分钟。

7. 去除分离的组织块, 将细胞悬液通过一个预分选滤器 (1-2个脾脏), 该预分选滤器放置于15mL管子中。或者将细胞悬液通过一个细胞过滤网 (3-6个小鼠脾脏), 该滤网放置于50mL试管中。

8.用5 mL 缓冲液洗涤预分选滤器 (Pre-Separation Filter) 或者细胞滤器

9. 弃去预选滤器或细胞滤器, 室温下以300g离心10分钟, 完全去上清。

10.用合适体积的缓冲液重悬细胞, 用于后续应用。

## 3.用胶原酶分离小鼠脾脏的操作步骤

### 3.1需要的仪器和试剂

- gentleMACS 分离器
- gentleMACS C 管 (# 130-093-237)
- 细胞滤器, 如30  $\mu$ m 尼龙滤网 ( Pre-Separation Filters# 130-041-407)
- 缓冲液: PBS缓冲液, pH 7.2,含 0.5% 牛血清白蛋白 (BSA), 和2 mM EDTA (不推荐使用含Ca<sup>2+</sup> or Mg<sup>2+</sup>的缓冲液), 4度保存。
- HEPES缓冲液: 10mM HEPES-NaOH pH7.4,150mM NaCl,5mM KCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 1.8mM CaCl<sub>2</sub>.
- 胶原酶D溶液: 用HEPES液配置终浓度为100mg/mL的胶原酶D溶液。
- DNase I溶液: 准备终浓度为20000U/mL的DNase I溶液

### 3.2 步骤

▲ 如制备的单细胞悬液用于细胞培养, 所有的步骤必须在无菌条件下获得。

▲ 一只小鼠脾脏的重量约为 80 - 120 mg (BALB母鼠, 6 - 7 周龄).

1. 将1-2个小鼠脾脏转移到gentleMACS C 管中, 在C管中加入4.9mL HEPES缓冲液, 同时加入100 $\mu$ L胶原酶D溶液 (终浓度为2mg/mL)

2. 拧紧C管盖子, 倒置在gentleMACS 分离器上

▲ 注意: 必须确保组织块在转子区域

3. 开机, 选择合适的分离程序: m\_spleen\_02.

4. 运行 gentleMACS 程序 m\_spleen\_02.

5. 程序结束后, 从gentleMACS 分离器中取出C管

6. 37° C孵育30分钟

7. 在C管中加入12.5-25 $\mu$ L的DNaseI溶液 (终浓度为50-100U/mL)

8. 拧紧C管盖子, 倒置在gentleMACS 分离器上

9. 选择和运行 gentleMACS 程序 m\_spleen\_03.

10. 程序结束后, 从gentleMACS 分离器中取出C管

11. (可选) 以 300 $\times$ g 室温下短暂离心。

12. 去除分离的组织块, 将细胞悬液通过一个预分选滤器, 该预分选滤器放置于15mL管子中。

- 13.用5 mL HEPES缓冲液洗涤预分选滤器 (Pre-Separation Filter) 或者细胞滤器
14. 弃去预选滤器或细胞滤器, 室温下以300g离心10分钟, 完全去上清。
- 15.用合适体积的缓冲液重悬细胞, 用于后续应用。

## 4.用胶原酶分离小鼠肺组织的操作步骤

### 4.1需要的仪器和试剂

- gentleMACS 分离器
- gentleMACS C 管 (# 130-093-237)
- MACSmix 试管混悬器 (# 130-093-753)
- 细胞过滤网, 70  $\mu$ m筛网
- 缓冲液: PBS缓冲液, pH 7.2, 含 0.5% 牛血清白蛋白 (BSA), 和2 mM EDTA (不推荐使用含Ca<sup>2+</sup> or Mg<sup>2+</sup>的缓冲液), 4度保存。
- HEPES缓冲液: 10mM HEPES-NaOH pH7.4, 150mM NaCl, 5mM KCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 1.8mM CaCl<sub>2</sub>.
- 胶原酶D溶液: 用HEPES液配置终浓度为100mg/mL的胶原酶D溶液。
- DNase I溶液: 准备终浓度为20000U/mL的DNase I溶液

### 4.2 步骤

- ▲ 如制备的单细胞悬液用于细胞培养, 所有的步骤必须在无菌条件下获得。
  - ▲ 一只小鼠脾脏的重量约为 110 - 150 mg (BALB母鼠, 6 - 7 周龄).
- 1.在一个含有PBS(pH7.2)的培养皿中解剖小鼠肺组织并清洗之。  
注:确保从小鼠肺组织中去除胸腺, 心肌, 输出神经, 血管, 气管, 结缔组织等。
  2. 将1个小鼠肺, 最多3个小鼠肺组织转移到gentleMACS C 管中, 在C管中加入4.9mL HEPES缓冲液, 同时加入100uL胶原酶D溶液 (终浓度为2mg/mL), 以及10uL DNase I溶液(1个小鼠肺组织)或者20uL DNase I溶液(2-3个肺组织)(DNase I终浓度: 1个肺: 40U/mL;2-3个肺: 80U/mL)
  3. 拧紧C管盖子, 倒置在gentleMACS 分离器上

- ▲ 注意: 必须确保组织块在转子区域
4. 开机, 选择合适的分离程序: m\_lung\_01.
  5. 运行 gentleMACS 程序 m\_lung\_01.
  6. 程序结束后, 从gentleMACS 分离器中取出C管
  7. 将C管放置在MACSmix试管旋转仪上, 37° C孵育30分钟。或者每隔5分钟, 手工摇匀C管, 重悬沉淀的组织块。
  8. 反应结束后, 将C管倒置在gentleMACS 分离器上
  9. 选择和运行 gentleMACS 程序 m\_lung\_02.
  10. 程序结束后, 从gentleMACS 分离器中取出C管
  11. (可选) 以 300×g 室温下短暂离心。
  12. 去除分离的组织块, 将细胞悬液通过一个70 μm的细胞过滤网, 该过滤网放置于50mL管子中。
  13. 用5 mL HEPES缓冲液洗涤预选分离器 (Pre-Separation Filter) 或者细胞滤器
  14. 弃去预选滤器或细胞滤器, 室温下以300g离心10分钟, 完全去上清。
  15. 用合适体积的缓冲液重悬细胞, 用于后续应用。

## 5.用胶原酶IV分离小鼠肝脏的操作步骤

### 5.1需要的仪器和试剂

- gentleMACS 分离器
- gentleMACS C 管 (# 130-093-237)
- MACSmix 试管混悬器 (# 130-093-753)、
- 红细胞裂解液 (130-094-183)
- 细胞过滤网, 70 μm筛网
- 缓冲液: PBS缓冲液, pH 7.2, 含 0.5% 牛血清白蛋白 (BSA), 和2 mM EDTA (不推荐使用含Ca<sup>2+</sup> or Mg<sup>2+</sup>的缓冲液), 4度保存。
- HEPES缓冲液: 10mM HEPES-NaOH pH7.4, 150mM NaCl, 5mM KCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 1.8mM CaCl<sub>2</sub>.
- 胶原酶IV溶液: 用KRB溶液制备含5000U的胶原酶IV溶液。(如胶原酶IV

C5138, Sigma-Aldrich)

- DNase I溶液：用KRB溶液制备终浓度为30000U/mL的DNase I溶液
- 0.5M CaCl<sub>2</sub>溶液
- 0.2M MgCl<sub>2</sub>溶液
- Krebs-Ringer-Buffer(KRB)溶液：154mM NaCl, 5.6mM KCl, 5.5mM葡萄糖, 20.1mM HEPES, 25mM NaHCO<sub>3</sub>, 用NaOH调节PH值至7.4

## 5.2 步骤

▲ 如制备的单细胞悬液用于细胞培养，所有的步骤必须在无菌条件下获得。

▲ 一只小鼠肝脏的重量约为 750 - 1200 mg (CD1鼠, 8周龄).

▲ 每C管能够处理一只小鼠肝脏

1. 在C管中加入4.4mL KRB溶液, 20uL CaCl<sub>2</sub>, 50uL MgCl<sub>2</sub>, 500uL 胶原酶IV和25uL DNase I溶液, 制成酶解液

▲注：为了保证胶原酶的效果，建议实验当天配置酶解液。

2. 在37° C下孵育酶解液30分钟

3. 用KRB溶液漂洗小鼠肝脏

注:确保从小鼠肺组织中去除胸腺, 心肌, 输出神经, 血管, 气管, 结缔组织等。

4. 将小鼠肝脏转移到gentleMACS C管中

5. 拧紧C管盖子, 倒置在gentleMACS 分离器上

▲ 注意: 必须确保组织块在转子区域

6. 开机, 选择合适的分离程序: m\_liver\_01.02

7. 运行 gentleMACS 程序 m\_liver\_01.02

8. 程序结束后, 从gentleMACS 分离器中取出C管

9. 将C管放置在MACSmix试管旋转仪上, 37° C孵育30分钟。

10. 反应结束后, 将C管倒置在gentleMACS 分离器上

▲ 注意: 必须确保组织块在转子区域

11. 选择和运行 gentleMACS 程序 m\_liver\_02.02

12. 程序结束后, 从gentleMACS 分离器中取出C管

13. (可选) 以  $300\times g$  室温下短暂离心, 收集管底的细胞标本。
14. 用PEB缓冲液清洗50mL试管和100 $\mu m$ 筛网的细胞过滤网, 弃去PEB缓冲液, 将预湿的细胞过滤网放置在试管上。
15. 重悬细胞, 将细胞通过细胞过滤网。用5mLPEB缓冲液洗涤C管后通过细胞过滤网。最后用10mLPEB缓冲液洗涤细胞过滤网。
16. 弃去细胞过滤网, 并在细胞标本中再加入10mLPEB缓冲液。
17. 在 $4^{\circ} C$ , 以17-21g离心4分钟, 去除污染的肝细胞。
18. 收集上清组分, 转移到一个50mL试管中, 试管预先用PEB缓冲液漂洗过。
19. 在 $4^{\circ} C$ , 以300xg离心10分钟后, 完全去上清。
20. 用1mL PEB缓冲液重悬细胞, 加入10mL 1X红细胞裂解液。
21. 室温下孵育5分钟
22. 孵育结束后, 加入30mL PEB缓冲液, 在 $4^{\circ} C$ , 以300xg离心10分钟后, 完全去上清。
23. 用1-2mL PEB缓冲液重悬细胞团块, 最后用PEB缓冲液调整体积至30mL.
24. 在 $4^{\circ} C$ , 以300xg离心10分钟后, 完全去上清。
25. 用PEB缓冲液重悬细胞至合适体积, 用于后续应用。

## 6. 从种植的小鼠体内肿瘤组织中制备单细胞悬液的操作步骤

### 6.1 需要的仪器和试剂

- gentleMACS 分离器
- gentleMACS C 管 (# 130-093-237)
- MACSmix 试管混悬器 (# 130-093-753)、
- 细胞过滤网, 70  $\mu m$ 筛网
- 缓冲液: PBS缓冲液, pH 7.2, 含 0.5% 牛血清白蛋白 (BSA), 和2 mM EDTA (不推荐使用含Ca<sup>2+</sup> or Mg<sup>2+</sup>的缓冲液), 4度保存。
- RPMI 1640 (# 130-091-440)
- Collagenase I 溶液: 用PBS制备含10,000 U/mL Collagenase I 的溶液(如 Collagenase I, Sigma-Aldrich, # C0130)

● Dispase II 溶液: 用PBS制备含32 mg/mL Dispase II 溶液(如 Dispase II, Roche, # 04942078001)

● DNase I 溶液: 制备含 5 MU/mL DNase I 溶液(如. DNase I, Calbiochem, # 260913)

## 6.2.步骤

▲ 如制备的单细胞悬液用于细胞培养, 所有的步骤必须在无菌条件下获得。

▲ 当使用MACSmix™ 试管混匀器时, 以持续运转模式进行操作, 转速约为12 rpm。或者每隔5分钟手工摇匀。

▲ 在下列的操作步骤中, 每C管处理0.2-3.5g肿瘤组织。

### (1) 从小鼠B16黑色素瘤组织中制备肿瘤浸润淋巴细胞

1. 将肿瘤组织切成大小约为5mm的小块
2. 将切成小块的肿瘤组织转移到含有5mL PEB缓冲液的gentleMACS C 管中
3. 拧紧C 管盖子, 倒置在gentleMACS分离器上

▲ 注: 必须确保组织块在转子区域

4. 开机, 并选择gentleMACS 程序 m\_impTumor\_01.

5. 运行 gentleMACS 程序 m\_impTumor\_01.

6. 程序结束后, 把C管从gentleMACS分离器中取下来

7. (可选) Perform a short centrifugation step to collect the sample material at the tube bottom.

(可选) 以 300×g 室温下短暂离心。

8. 去除分离的组织块, 将细胞悬液通过一个70 μm的细胞过滤网, 该过滤网放置于50mL管子中。

9.用5 mL PEB缓冲液洗涤细胞过滤网

10. 弃去细胞过滤网, 补充细胞体积至50mL

11. 室温下以300g离心10分钟, 完全去上清。

12. 重悬细胞, 加入PEB缓冲液至总体积为50 mL.

13. 室温下以300g离心10分钟, 完全去上清

14. 用合适体积的缓冲液重悬细胞, 用于后续应用。



(2) 从小鼠B16黑色素瘤，CT26大肠癌肿瘤组织，或胰腺癌肿瘤组织中制备肿瘤浸润淋巴细胞和肿瘤细胞的步骤

### 2.2.1 从小鼠B16黑色素瘤和小鼠CT26大肠癌中制备单细胞悬液

1. 将肿瘤组织切成大小约为5mm的小块
2. 将切成小块的肿瘤组织转移到含有5mL RPMI 1640缓冲液的gentleMACS C管中

3. 拧紧C管盖子，倒置在gentleMACS分离器上

▲ 注：必须确保组织块在转子区域

4. 开机，并选择gentleMACS 程序 m\_impTumor\_02.
5. 运行 gentleMACS 程序 m\_impTumor\_02.
6. 程序结束后，把C管从gentleMACS分离器中取下来
- 7.在C管中加入 150  $\mu$ L of Collagenase I 溶液和150  $\mu$ L Dispase II溶液
8. 将C管置于MACSmix™试管旋转仪中，在37 ° C下孵育40 分钟
9. 孵育结束后，在C管中加入2  $\mu$ L DNase I 溶液
10. 拧紧C管盖子，倒置在gentleMACS分离器上

▲ 注：必须确保组织块在转子区域

11. 如果分离小鼠 B16 黑色素瘤组织，选择和运行gentleMACS程序 m\_impTumor\_02.

如果分离小鼠 CT26 大肠癌组织， 选择和运行gentleMACS程序 m\_impTumor\_03.

12. 程序结束后，把C管从gentleMACS分离器中取下来
13. (可选)短暂离心，收集管底的样本
- 14.重悬样本，将细胞悬液通过一个70  $\mu$ m的细胞过滤网，该过滤网放置于50mL管子中。
15. 用5 mL PEB缓冲液洗涤细胞过滤网
16. 拿开细胞过滤网，补充PEB 缓冲液至总体积50 mL.
17. 室温下以 300 $\times$ g离心10分钟，彻底去上清
- 18.用 PEB 缓冲液重悬细胞，加入合适的体积用于后续应用

### 2.从小鼠mPAC胰腺癌组织中制备单细胞悬液

1. 将肿瘤组织切成大小约为5mm的小块
2. 将切成小块的肿瘤组织转移到含有5mL RPMI 1640缓冲液的gentleMACS C管中
3. 加入150  $\mu$ L Collagenase I 溶液和150  $\mu$ L Dispase II溶液
4. 拧紧C管盖子，将C管放置于MACSmix试管旋转仪上，37 ° C下孵育20分钟
5. 孵育结束后，将C管倒置在gentleMACS分离器上
- ▲ 注：必须确保组织块在转子区域
6. 开机，并选择gentleMACS 分离器程序 m\_impTumor\_04.
7. 运行gentleMACS程序 m\_impTumor\_04.
8. 反应结束后，将C管从 gentleMACS分离器中取下
9. 将C管放置于MACSmix试管旋转仪上，37 ° C下孵育20分钟
10. 孵育结束后，加入2  $\mu$ L DNase I 溶液
11. 将C管倒置在gentleMACS分离器上
- ▲ 注：必须确保组织块在转子区域
12. 选择并运行 gentleMACS 程序 m\_impTumor\_04.
13. 反应结束后，将C管 gentleMACS分离器中取下
14. (可选)短暂离心，收集管底的样本
15. 重悬样本，将细胞悬液通过一个70  $\mu$ m的细胞过滤网，该过滤网放置于50mL管子中。
16. 用5 mL PEB缓冲液洗涤细胞过滤网
17. 拿开细胞过滤网，补充PEB 缓冲液至总体积50 mL.
18. 室温下以 300 $\times$ g离心10分钟，彻底去上清
- 19.用 PEB 缓冲液重悬细胞，加入合适的体积用于后续应用

## 7.从小鼠神经组织中制备单细胞悬液

### 7.1 需要的仪器和试剂

- gentleMACS 分离器
- gentleMACS C管 (# 130-093-237)

- MACSmix™ 试管旋转仪 (# 130-090-753)
- 细胞过滤网, 如. 30 μm尼龙网筛 Pre-Separation Filters (# 130-041-407)
- MACS® Neural Tissue Dissociation Kit (P) (# 130-092-628)或 MACS Neural Tissue Dissociation Kit (T) (# 130-093-231)
- Hanks' 平衡液(HBSS) , 不含 Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> (Sigma-Aldrich #H4891), 在文中称为HBSS (w/o)
- 含有Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>的HBSS 液 (Sigma-Aldrich #H1387),在文中称为HBSS (w)
- Beta-巯基乙醇 (如Sigma, # 63689)

## 7.2 从小鼠神经组织中制备单细胞悬液的步骤

试剂准备:

神经组织分离试剂盒 (Neural Tissue Dissociation Kits (NTDK)) 的组分见下表

	Solution 1 [mL]	Solution 2 [mL]	Solution 3 [mL]	Solution 4 [mL]	Solution 5 [mL]
NTDK(P)	2.5	2×50	1	7	0.7
NTDK(T)	10	2×50	1	7	0.7

1. 在溶液2中加入beta-巯基乙醇 , 终浓度为0.067 mM. 如, 加入 13.5 μL 的50 mM beta-巯基乙醇 到10 mL 溶液 2中.

▲ 注: 在4 ° C下能稳定保存 1 个月

2.加0.7 mL 储存液到溶液4瓶中, 重悬瓶中的冻干粉, 作为溶液4, 不用剧烈混匀。如用于细胞培训, 该溶液要过滤除菌, 保存于 -20 ° C 备用

3. 按照下表, 准备 1950 μL 酶混合物 1 , 最多可用于400 mg 组织的酶解。将酶混合物1加到 gentleMACS™ C 管中, 用前在37 ° C下预热10–15 minutes

	Enzyme mix 1		Enzyme mix 2	
NTDK(P)	Solution 1	Solution 2	Solution 3	Solution 4
	50 μL	1900 μL	20 μL	10 μL

NTDK(T)	Solution 1	Solution 2	Solution 3	Solution 4
	200 $\mu$ L	1750 $\mu$ L	20 $\mu$ L	10 $\mu$ L

## 步骤:

▲ 下列步骤中所给出的体积，均是按照制备400 mg 小鼠脑组织。如果样本重量小于400 mg, 也使用相同的体积。如果样本重量大于 400 mg, 按比例放大试剂体积和总体积。

▲ 每个C管最多能处理1600 mg 小鼠脑组织， 总体积不应超过10 mL.

▲ 如制备的单细胞悬液用于细胞培养，所有的步骤必须在无菌条件下获得。

▲ 当使用MACSmix™ 试管混匀器时，以持续运转模式进行操作，转速约为12 rpm。

1. 在1 mL 冷的 HBSS (w/o)液中称重.

2.在gentleMACS C 管中预先加入 1950  $\mu$  L 预热的酶混合物1(每400 mg组织), 将小鼠脑组织转移到C管中。

3. 拧紧C 管盖子，将C管倒置在gentleMACS分离器上

▲ 注意: 必须确保组织块在转子区域

4. 开机，并选择gentleMACS分离器程序m\_brain\_01.

5. 运行 gentleMACS 程序m\_brain\_01.

6. 反应结束后，从gentleMACS 分离器中取出C管

7. 将C管放置在MACSmix试管选择仪上，在37 ° C下孵育 15 分钟。

8. 将C管倒置在gentleMACS分离器上

▲ 注意: 必须确保组织块在转子区域

9. 选择并运行gentleMACS程序 m\_brain\_02.

10.反应结束后，取出C管

11. 每400mg脑组织，准备30  $\mu$  L 酶混合物2

12. 将enzyme 混合物2 加到C管中，轻轻混匀，不要剧烈混匀。.

13. 将C管放置在MACSmix试管选择仪上，在37 ° C下孵育10分钟。

14. 将C管倒置在gentleMACS分离器上

▲ 注意: 必须确保组织块在转子区域

15. 选择并运行gentleMACS程序 m\_brain\_03.

16. 从gentleMACS分离器中取出C管

17. 将C管放置在MACSmix试管选择仪上, 在37 ° C下孵育10分钟。

18. (可选) 室温下以300×g 离心2分钟

19. 去除分离的组织, 将细胞通过一个预分选滤器, 预分选滤器放置在15mL试管中。

▲ 注: 当分离的组织重量超过400 mg时, 使用50mL试管和细胞过滤网。

▲ 注: 如细胞直径大于30 μ m, 例如Purkinje细胞或运动神经元, 可能会丢失。为了获得这些细胞, 使用孔径较大的细胞筛网。

20. 用 10 mL of HBSS (w)液洗涤预分选滤器。

▲ 注: 当分离的组织重量超过400 mg时, 用30mL HBSS (w)液洗涤细胞过滤网。

21. 弃去预分选滤器, 室温下以300×g 离心10分钟, 完全弃上清。

22. (可选) 用 10 mL HBSS (w) 液重悬细胞, 室温下以300×g离心10分钟, 完全弃上清。

23. 用合适的体积重悬细胞, 用于后续应用。、

▲ 注: 如果洗涤后, 出现结实的细胞块, 每毫升细胞悬液加入30 μ L 的酶混合物 2, 轻轻混匀后, 放置于MACSmix试管旋转仪上, 37 ° C 孵育5分钟后, 重复22, 23步骤。

## 8. 用胶原酶II分离小鼠心脏的操作步骤

### 8.1 需要的仪器和试剂

- gentleMACS 分离器
- gentleMACS C 管 (# 130-093-237)
- MACSmix 试管混悬器 (# 130-093-753)、
- 红细胞裂解液 (130-094-183)
- 细胞过滤网, 70 μ m筛网
- PEB缓冲液: PBS缓冲液, pH 7.2, 含 0.5% 牛血清白蛋白 (BSA), 和2 mM EDTA, 4度保存。

- 含Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>的HEPES缓冲液
- 胶原酶II溶液：用HBSS液制备含10000U的胶原酶II溶液。（如胶原酶IV C5138, Sigma-Aldrich）
- DNase I溶液：制备含30000U/mL的DNase I溶液

## 8.2 步骤

▲ 如制备的单细胞悬液用于细胞培养，所有的步骤必须在无菌条件下获得。

▲ 一只小鼠肝脏的重量约为 80 - 115 mg (Bab/c母鼠, 6-7周龄).

▲ 每C管能够处理一到四个小鼠心脏

1. 将小鼠心脏切成2半后，用冷的HBSS液洗涤

2. 在C管中加入4.7mL HBSS液， 300uL 胶原酶II和10uL DNase I溶液，制成酶解液，然后将小鼠肝脏转移到gentleMACS C 管中。

▲注：在本操作中必须使用胶原酶II，其它胶原酶不能使用。

3. 拧紧C管盖子，倒置在gentleMACS 分离器上

▲ 注意：必须确保组织块在转子区域

4. 开机，选择合适的分离程序: m\_heart\_01.

5. 运行 gentleMACS 程序 m\_heart\_01.

6. 程序结束后，从gentleMACS 分离器中取出C管

7. 将C管放置在MACSmix试管旋转仪上，37° C孵育30分钟。

8 反应结束后，将C管倒置在gentleMACS 分离器上

▲ 注意：必须确保组织块在转子区域

9. 选择和运行 gentleMACS 程序 m\_heart\_02.

10. 程序结束后，从gentleMACS 分离器中取出C管

11. (可选) 以 300×g 室温下短暂离心，收集管底的细胞标本。

12. 重悬细胞，将细胞通过细胞过滤网。细胞滤网放置在50mL试管中。

13. 用5mL HBSS液洗涤细胞过滤网

14. 取出细胞过滤网，室温下以300xg离心10分钟后，完全去上清。

15. 用1mL PEB缓冲液重悬细胞，加入10mL 1X红细胞裂解液。

16. 室温下孵育2分钟。（不能超过2分钟）
17. 孵育结束后室温下以300xg离心10分钟后，完全去上清。
18. 用1 PEB缓冲液重悬细胞团块，最后用PEB缓冲液调整体积至10mL。
19. 室温下以300xg离心10分钟后，完全去上清。
20. 用PEB缓冲液重悬细胞至合适体积，用于后续应用。

## 9. 用胶原酶分离人脐带组织的操作步骤

### 3.1 需要的仪器和试剂

- gentleMACS 分离器
- gentleMACS C 管 (# 130-093-237)
- 细胞滤器，如30  $\mu$ m 尼龙滤网 ( Pre-Separation Filters# 130-041-407)
- 缓冲液: PBS缓冲液, pH 7.2, 含 0.5% 牛血清白蛋白 (BSA), 和2 mM EDTA (不推荐使用含Ca<sup>2+</sup> or Mg<sup>2+</sup>的缓冲液), 4度保存。
- I型胶原酶溶液: 用PBS配置终浓度为0.12 PZU/ml的I型胶原酶溶液。
- DNase I溶液: 准备终浓度为20000U/mL的DNase I溶液

### 3.2 步骤

- ▲ 如制备的单细胞悬液用于细胞培养，所有的步骤必须在无菌条件下获得。
- 1. 将脐带组织剪切成5X5mm大小的组织块，转移到gentleMACS C 管中，在C管中加入5mL HEPES I型胶原酶溶液。
- 2. 拧紧C管盖子，倒置在gentleMACS 分离器上
- ▲ 注意: 必须确保组织块在转子区域
- 3. 开机，选择分离程序: E.
- 4. 运行 gentleMACS 程序E 1分钟。
- 5. 程序结束后，从gentleMACS 分离器中取出C管
- 6. 37° C孵育4小时。
- 7. (可省略) 在C管中加入12.5-25 $\mu$ L的DNaseI溶液 (终浓度为50-100U/mL)

8. 拧紧C管盖子，倒置在gentleMACS 分离器上
9. 选择和运行 gentleMACS 程序 m\_spleen\_03.
10. 程序结束后，从gentleMACS 分离器中取出C管
11. (可选) 以 300×g 室温下短暂离心。
12. 去除分离的组织块，将细胞悬液通过一个预分选滤器，该预分选滤器放置于15mL管子中。
- 13.用5 mL PBS缓冲液洗涤预分选滤器（Pre-Separation Filter）或者细胞滤器
14. 弃去预选滤器或细胞滤器，室温下以300g离心10分钟，完全去上清。
- 15.用合适体积的缓冲液重悬细胞，用于后续应用。

飞扬生物科技有限公司  
服务热线：029-68816309  
邮箱：ydulei@163.com  
www.feiyangbio.com