

组织制备成单细胞悬液的实验方案

实体组织单细胞悬液制备的酶消化法：

酶消化法是实体组织向单细胞分散的主要方法之一。常见的酶有：链霉蛋白酶，胃蛋白酶，中性蛋白酶，胰蛋白酶，木瓜蛋白酶，溶菌酶，弹性蛋白酶等，所使用的酶可以根据分散的组织类型进行确定。但需注意其使用条件和影响因素，胃蛋白酶在碱性环境下会失去活性，胰蛋白酶在中性溶液中活性会缺失等。

酶的原理有三个主要的方面：破坏组织间的胶原纤维，弹性纤维等，水解组织细胞与结构紧密结合的蛋白，水解粘多糖的组织细胞。

溶液和试剂

细胞组织在酶消化法下的操作：

1. 先将组织剪成泥状。
2. 用胰蛋白酶或胶原酶消化组织块，胰蛋白酶适用于消化细胞间质较少的软组织，如胚胎、上皮、肝、肾等组织。胰蛋白酶工作浓度一般为 0.1%—0.5%。对于纤维较多的组织或较硬的癌组织常用 0.25% 胶原酶，胶原酶对组织中胶原蛋白类结构消化作用强，它仅对细胞间质有消化作用而对上皮细胞影响不大。胶原酶常用浓度为 0.1—0.3 $\mu\text{g} / \text{ml}$ ，用大于组织量 30—50 倍的胰蛋白酶液或胶原酶液在 37℃，摇床上消化组织，消化时间的长短根据组织类型而定，一般来说，胰蛋白酶需作用 20—60 min，胶原酶需作用 1—4h 左右，一般还会加入 DNA 核酸内切酶。
3. 消化完毕后，将细胞悬液通过 200 目孔径尼龙网过滤，以除掉未充分消化的组织；
4. 已过滤的细胞悬液经 1500rpm 离心 5min 后，弃上清液，加红细胞裂解液重悬沉淀，室温作用 5min，加等体积的 PBS 中和后，1500rpm 离心 5min，弃上清，用 PBS 洗涤一次，再用 PBS 重悬，细胞计数后即可使用。

下表整理了人和小鼠常见的不同组织处理方法，并附上参考文献

Species	Cells	Enzyme(s)	Reference
Human	脂肪细胞	2型胶原酶:0.01-0.5%	Effect of Collagenase Concentration on The Isolation of Small Adipocytes from Human Buccal Fat Pad., J Oral Sci, 2018
Human	脂肪细胞	Collagenase Type 1: 0.1%	Epigenome-wide Association Study of Body Mass Index, and the Adverse Outcomes of Adiposity, Nature541, 81, 2017
Human	基质细胞	胶原酶2型:0.075%	Ultrasound-Assisted Liposuction Provides a Source for Functional Adipose-Derived Stromal Cells., Cytotherapy 19, 1491-1500, 2017
Human	骨髓基质细胞	胶原酶1型:0.075%	Mesenchymal Stromal Cells Protect Human Cardiomyocytes from Amyloid Fibril Damage, Cytotherapy 19, 1426-1437, 2017
Human	间充质干细胞	胶原酶2型:0.2%	Adipogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Alters Their Immunomodulatory Properties in a Tissue-Specific Manner., Stem Cells 35, 1636-1646, 2017
Human	脂肪源内皮细胞	胶原酶1型:0.1%	Autologous Cell Sources in Therapeutic Vasculogenesis: In Vitro and In Vivo Comparison of Endothelial Colony-Forming Cells from Peripheral Blood and Endothelial Cells Isolated from Adipose Tissue., Cytotherapy 18, 242-52, 2016
Human	脂肪干细胞	胶原酶1型:0.1%	High Glucose-Induced Reactive Oxygen Species Generation Promotes Stemness in Human Adipose-Derived Stem Cells, Cytotherapy 18, 371-83, 2016
Human	骨髓基质细胞	胶原酶4型:0.2%	Effect of Mild Heat Stress on the Proliferative and Differentiative Ability of Human Mesenchymal Stromal Cells., Cytotherapy17, 359-68, 2015
Human	脂肪干细胞	胶原酶2型:0.1%	Expression Analysis of Human Adipose-Derived Stem Cells During In Vitro Differentiation to an Adipocyte Lineage., BMC Med Genomics 8, 41, 2015
Human	脂肪基质	胶原酶1型:0.075%	Therapeutic Potential of Adipose-Derived SSEA-3-Positive Muse Cells for Treating Diabetic Skin Ulcers., Stem Cells Transl Med 4, 146, 2015
Human	脂肪组织细胞	胶原酶1型:0.1%	Differential Effects of Processing Time and Duration of Collagenase Digestion on Human and Murine Fat Grafts., Plast Reconstr Surg 136, 189e-199e, 2015

Human	脂肪 基质 血管 细胞	中性蛋白 酶:2.4 u/ml	Human White and Brite Adipogenesis is Supported by MSCA1 and is impaired by Immune Cells., Stem Cells 33, 1277-91, 2015
Human	脂肪 源性 间充 质干 细胞	胶原酶2 型:0.1%	Defined Serum-Free Media for In Vitro Expansion of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells., Cytotherapy 16, 915, 2014
Human	脂肪 提取 干细 胞	胶原酶1 型:0.15%	Choosing the Right Type of Serum for Different Applications of Human Adipose Tissue-Derived Stem Cells: Influence on Proliferation and Differentiation Abilities., Cytotherapy 16, 789, 2014
Human	间充 质基 质	胶原酶1 型:0.1%	Proliferative and Phenotypical Characteristics of Human Adipose Tissue-Derived Stem Cells: Comparison of Ficoll Gradient Centrifugation and Red Blood Cell Lysis Buffer Treatment Purification Methods., Cytotherapy 16, 1220-8, 2014
Human	脂肪 间质 干细 胞	动物游离胶 原酶:200u /ml	Xenofree Enzymatic Products for the Isolation of Human Adipose-Derived Stromal/Stem Cells., Tiss Eng 19, 473-8, 2013
Human	基质 血管 成分	胶原酶1 型:0.075%	Stromal Vascular Fraction Isolated from Lipo-Aspirates Using an Automated Processing System: Bench and Bed Analysis., J Tissue Eng Regen Med 7, 864, 2013
Human	脂肪 干细 胞	胶原酶1 型:0.1%	Platelet-Rich Plasma Greatly Potentiates Insulin-Induced Adipogenic Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells Through a Serine/Threonine Kinase Akt-dependent Mechanism and Promotes Clinical Fat Graft Maintenance., Stem Cells Transl Med 1, 206-20, 2012
Human	血管 周围 干细 胞	胶原酶2 型:0.1%	An Abundant Perivascular Source of Stem Cells for Bone Tissue Engineering., Stem Cells Transl Med 1, 673, 2012
Human	脂肪 来源 的间 质血 管	胶原酶1 型:0.1%	Concise Review: Adipose-Derived Stromal Vascular Fraction Cells and Platelet-Rich Plasma: Basic and Clinical Implications for Tissue Engineering Therapies in Regenerative Surgery., Stem Cells Transl Med 1, 230-6, 2012

Mouse	脂肪 基质	胶原酶1 型:0.1%	Adipose Stromal Vascular Fraction-Mediated Improvements at Late-Stage Disease in a Murine Model of Multiple Sclerosis., Stem Cells 35, 532-544, 2017
Mouse	脂肪 间质 细胞	胶原酶2 型:0.2%	Adipose Mesenchymal Stromal Cells Minimize and Repair Radiation-Induced Oral Mucositis., Cytotherapy 18, 1129-45, 2016
Mouse	脂肪 基质	胶原酶1 型:0.1%	Improved Mobilization of Exogenous Mesenchymal Stem Cells to Bone for Fracture Healing and Sex Difference., Stem Cells 34, 2587-2600, 2016
Mouse	脂肪 细胞	胶原酶:0.1%	The Effects of A Single Developmentally-Entrained Pulse of Testosterone in Female Neonatal Mice On Reproductive and Metabolic Functions in Adult Life., Endocrinology 156, 3737, 2015
Mouse	间质 血管 细胞	胶原酶2 型:0.2%	Natural Killer T Cells in Adipose Tissue are Activated in Lean Mice., Exp Anim 62, 319, 2013
Mouse	脂肪 干细 胞	胶原酶2 型:0.1%	Biological and Clinical Availability of Adipose-Derived Stem Cells for Pelvic Dead Space Repair., Stem Cells Transl Med 1, 803, 2012

实体组织单细胞悬液制备的机械法：

应用刀片切割粉碎细胞组织，用均浆机将其均匀打浆，用线注射针反复抽取细胞等，然后应用 300 目尼龙网过滤细胞将获得制备后的单细胞悬液。

一、网搓法

1. 把 100 目和 300 目的尼龙网系在一个小烧杯上
2. 把剪切好的组织碎块放在尼龙网上，用小镊子轻轻的摩擦组织块，并边摩擦边用生理盐水对其进行冲洗，直至组织被摩擦完
3. 吸取收集细胞悬液，以 500~800 转/分钟的速度对其细胞组织进行离心沉淀几分钟
4. 离心结束后，将其细胞固定或低温进行储存

二、剪切法

1. 把组织块放在平皿里，在加少量的生理盐水。
2. 将其组织剪切成均匀的浆状，在其内添加 10ml 的盐水。
3. 用吸管吸取组织均匀的浆液，要先用 100 目的尼龙网将其过滤到试管中。

4. 以 1000 转/分钟离心沉淀几分钟，然后用生理盐水洗涤 3 次，每次以 500~800 转/分钟的低速短时间离心沉淀，去除细胞碎片。
5. 选用 300 目的尼龙网对细胞进行过滤去除。
6. 选择合适的固定液或百分之 70 的冰乙醇等都可，将其细胞固定或低温储存以备后用。

实体组织单细胞悬液制备的化学处理法

化学处理法的主要原理是：将组织细胞间起粘连作用的钙、镁离子置换出来，从而使细胞分散下来。

1、试剂配制

- 1) 0.2%EDTA 配制：将 0.2gEDTA 溶解于 100ml Hank 液中，封装高压消毒，置 0~4℃保存。
- 2) 胰酶加 EDTA 配制：胰酶 0.25g 加 PBS (pH7.0) 200ml，浓度为 0.125%，EDTA0.2g 加 PBS (pH7.0) 100ml，浓度为 0.2%。各取 40ml 混合，分装后置 0~4℃冰箱保存，使用前过滤即可使用。

2、实验方法

- 1) 将组织切成薄片，置于试管。
- 2) 首先加入 EDTA 液 5ml，室温下 0.5 小时，离心弃之。
- 3) 加入胰酶—EDTA 液 5~10ml，置 37℃恒温水浴 30min，间断振荡 3~5 次。
- 4) 用 300 目尼龙网过滤，离心沉淀 1000rpm/min，5 分钟。再以生理盐水洗 2~3 次，离心 500~800rpm，1~2 分钟。
- 5) 将细胞固定或低温保存备用。

化学处理法获得的细胞存活率低，细胞产量较低，细胞碎片和细胞聚集量不稳定。