**实体组织单细胞悬液的制备方法**

流式细胞术对于细胞的各种分析基于单细胞的基础上，因此实体组织需要先制备成单细胞悬液。根据不同实体组织成分的特点可以选择不同的分散细胞的方法，以期达到单细胞产量高、细胞损伤小的目的。在实体组织分散为单细胞的过程中，解离方法可能瞬间或持久地影响细胞的性质，因此处理不同组织时，努力摸索方法，尽可能采用对细胞损伤小、产率较高的单细胞悬液制备方法，最大限度保持细胞原有特性。常用的制备方法包括酶消化法、机械分离法和化学处理法。下面介绍几种方法的通用流程，以供参考。

（一）酶消化法

酶的作用原理主要有三方面：一是破坏组织间的胶原纤维、弹性纤维等，二是水解组织细胞的紧密连接结构的蛋白质，三是水解组织粘多糖物质。酶消化法是将实体组织分散为单细胞的主要方法之一。常用的酶类有：胃蛋白酶、木瓜蛋白酶、链霉蛋白酶、中性蛋白酶、胰蛋白酶、溶菌酶、弹性蛋白酶等。可根据分散的组织类型确定使用的酶类。需要注意的是使用条件和影响因素（酶浓度、酶效价、作用时间、pH值）等。

酶消化法常规程序如下：

1、将组织剪碎为2-4 mm直径的碎块，置于离心管中。

2、将酶混合液1-2 mL加入离心管中，颠倒吹打混匀。

3、在恒温条件下（一般为37℃）摇床上轻柔晃动消化，消化时间根据消化的效果来决定。

4、终止消化，加入含有血清的完全培养基终止消化。依次以100 m和70 m的滤膜过滤，除去细胞团块，并用培养基冲洗滤膜，获得单细胞悬液。

5、低速离心（如300g 5分钟），弃去上清，加入2 mL 含有2% BSA的PBS重悬，再次低速离心，弃去上清。重复洗涤一次。

6、制备好的细胞可进行荧光标记后上机检测或保存备用。

（二）机械法

机械法适用于较为松散的组织，如脾、肝脏等。操作方法有:剪碎法、研磨法、网搓法等，最后用300目尼龙网过滤细胞得到单细胞悬液。

1. 剪碎法
2. 将组织放入小皿中，加入含有2% BSA的PBS中；
3. 用剪刀将组织剪至匀浆状；
4. 加入10ml含有2% BSA的PBS；
5. 用吸管吸取组织匀浆，先以100目尼龙网过滤到试管中；
6. 1000 rpm离心4～5 min，再用含有2% BSA的PBS洗3次，每次以短时低速（500～800rpm）离心沉淀去除细胞碎片；
7. 以300目尼龙网过滤去除细胞；
8. 制备好的细胞可进行荧光标记后上机检测或保存备用。
9. 研磨法
10. 先将组织剪碎成1～2 mm3小块；
11. 放入组织研磨器中加入1～2 mL 生理盐水；
12. 转动研棒，研至匀浆；
13. 加入10ml含有2% BSA的PBS，冲洗研磨器；
14. 收集细胞悬液，并经300目尼龙网过滤，500～800 rpm离心2分钟，弃上清，用含有2% BSA的PBS重悬，并重复该过程3遍；
15. 制备好的细胞可进行荧光标记后上机检测或保存备用。
16. 网搓法
17. 将100目扎在小烧杯上；
18. 把剪碎的组织放在网上，用眼科镊子轻轻搓组织块，边搓边用含有2% BSA的PBS冲洗，直到将组织搓完。或使用注射器里的推杆，在网上轻碾研搓，直到将组织搓完；
19. 收集细胞悬液，用300目尼龙网过滤，收集滤出液；
20. 500～800 rpm离心2分钟，弃去上清。用含有2% BSA的PBS重悬细胞沉淀；
21. 制备好的细胞可进行荧光标记后上机检测或保存备用。

（三）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，从而得到单细胞悬液。

1. 试剂配制
2. 0.2%EDTA配置：将0.2gEDTA溶解于100ml Hank液中，封装高压消毒，置0-4度保存。
3. 胰酶加EDTA 的配置：胰酶0.25g加PBS（pH 7.0）200 mL，浓度为0.125%，EDTA 0.2g加PBS（pH 7.0）100 mL，浓度为0.2%。各取40 mL混合，分装后置0-4度冰箱保存，使用前过滤。
4. 实验方法
5. 将组织切成薄片，置于试管中；
6. 首先加入EDTA液5 mL，室温下孵育0.5小时，离心弃之；
7. 加入胰酶-EDTA液5-10 mL，置37度恒温水浴30 min，间断振荡3-5次；
8. 用300目尼龙网过滤，1000 rpm离心5分钟，弃上清。再用PBS重悬细胞，清洗2-3次，每次500-800 rpm离心1-2 min;
9. 制备好的细胞可进行荧光标记后上机检测或保存备用。

经验总结:

1、单独使用机械法和化学处理法，细胞产量较低，细胞碎片较多，细胞存活率也较低。单独使用酶消化法比较费时，对于一些有严格时间要求的实验来说不能选择，而美天旎的组织解离器和检测组织对应的解离试剂盒，是采用机械法和酶消化法相结合，可以避免各自单独使用的缺点，制备单细胞悬液的效率较高；

2、操作中细胞损伤时，DNA外泄容易造成细胞聚团的情况，在酶解液中添加DNaseI可以有效的改善这种情况。

3、操作过程中动作应轻柔，重悬细胞时轻轻吹打即可重悬。若发生细胞聚团，则弃去聚团细胞。

4、血细胞含量丰富的组织，如胰脏和肝脏，可根据需要增加裂解红细胞的步骤。

5、尽量使用新鲜制备的单细胞悬液进行检测。若无法及时检测，可以用4% PFA固定。但固定后的细胞容易破碎，需要注意。