



Miltenyi Biotec

德国美天旎生物技术有限公司

**gentleMACS Octo with Heaters**

组织处理器

使用培训手册



# 目录

培训日程安排 .....	3
培训所需设备/试剂.....	4
仪器安装及开机 .....	7
仪器界面介绍 .....	9
组织处理器的操作 .....	11
创建新程序 .....	14
仪器程序升级 .....	20
仪器的清洁维护 .....	21
示例：人肿瘤组织解离.....	22
示例：小鼠肺脏组织解离.....	24
示例：小鼠脾脏解离.....	26

# 培训日程安排

## Part1 组织处理器及样本制备介绍

- ◇ 常见组织样本制备流程
- ◇ gM8H 性能参数介绍
- ◇ gM8H 操作界面介绍
- ◇ 美天旒解离试剂盒介绍
- ◇ C管、M管及滤器介绍
- ◇ 应用案例

## Part2 仪器操作培训

- ◇ 组织处理器的拆箱及安装
- ◇ 通电开机检测
- ◇ 仪器结构介绍及界面操作
- ◇ 仪器编程功能操作
- ◇ 程序升级操作演示
- ◇ 日常仪器清洁维护

## Part3 演示实验

- ◇ 样本的准备
- ◇ 酶、试剂的配置
- ◇ 仪器程序设置
- ◇ 实验操作
- ◇ 结果观察

## 培训所需设备/试剂

1. 普通低速离心机（实验要求为 300 g，相当于 1000~1500 rpm，可调转速调时间，能离心 50 mL 离心管或 15 mL 离心管）；
2. 固定或可调节的移液器及相应枪头若干：20ul，50ul，100ul，200ul，1ml；
3. 50 mL 离心管或 15 mL 离心管、1.5 mL EP 管若干；
4. 剪刀、镊子等常用手术器械；
5. 无菌培养皿数个；
6. C 管或 M 管；
7. MACS SmartStrainer 滤器（30  $\mu\text{m}$ 、70  $\mu\text{m}$ 、100  $\mu\text{m}$ ）；
8. （可选）MACS 组织保存液（货号：130-100-008）；
9. RPMI 1640 或者 DMEM 培养基（不含血清）；
10. 相应的组织解离试剂盒（详情见表 1）；
11. PBS 缓冲液；
12. （可选）显微镜、载玻片、盖玻片及台盼蓝；




### C 管/M 管

1. 紫色的 C 管通常用于温和的制备单细胞悬液；
2. 橙色的 M 管通常用于制备组织匀浆；
3. 每个管子的容量一般是 300  $\mu\text{L}$ ~10 mL，组织样本质量为 20 mg~4 g；
4. 每个管子为独立无菌包装；

产品	规格	货号	
	C 管	25 个	130-093-237
		100 个	130-096-334
	M 管	25 个	130-093-237
		100 个	130-093-237

## MACS<sup>®</sup> SmartStrainers

该滤器用于组织解离后过滤去除残余的大块组织或细胞团块，可兼容 15 mL 和 50 mL 试管，有三种不同的孔径规格：30 $\mu$ m、70 $\mu$ m 和 100 $\mu$ m，根据组织类型和目的细胞选择不同孔径的滤器。

产品	规格	货号	
	MACS SmartStrainers (30 $\mu$ m)	50 个	130-098-458
	MACS SmartStrainers (70 $\mu$ m)	50 个	130-098-462
	MACS SmartStrainers (100 $\mu$ m)	50 个	130-098-463

## MACS<sup>®</sup> 组织解离试剂盒



即用型的酶混合试剂盒，内含有多种高纯度酶（冻干粉）及相关溶剂，溶解后于-20 $^{\circ}$ C保存，建议分装保存，避免反复冻融。该试剂盒结合组织处理器及预置的优化程序，可以方便快捷的完成单细胞悬液的制备，获得高活性的单细胞悬液。

**表 1：组织解离试剂盒**

货号	组织解离试剂盒	规格	用途
130-095-929	Tumor Dissociation Kit, human	25 tests	解离人肿瘤组织
130-096-730	Tumor Dissociation Kit, mouse	50 tests	解离小鼠肿瘤组织
130-105-808	Adipose Tissue Dissociation Kit, mouse and rat	50 tests	解离小鼠或大鼠脂肪组织
130-097-410	Lamina Propria Dissociation Kit, mouse	50 tests	解离小鼠肠粘膜固有层组织
130-105-807	Liver Dissociation Kit, mouse	25 tests	解离小鼠肝脏组织(获得非肝脏实质细胞)
130-095-927	Lung Dissociation Kit, mouse	50 tests	解离小鼠肺脏组织
130-095-926	Spleen Dissociation Kit, mouse	50 tests	解离小鼠脾脏组织
130-098-305	Skeletal Muscle Dissociation Kit, mouse and rat	50 tests	解离小鼠或大鼠骨骼肌组织
130-101-540	Whole Skin Dissociation Kit, human	50 tests	解离人全皮肤组织
130-105-737	Umbilical Cord Dissociation Kit, human	25 tests	解离人脐带组织
130-095-928	Epidermis Dissociation Kit, mouse	25 tests	解离小鼠表皮组织
130-103-464	Epidermis Dissociation Kit, human	100 tests	解离人表皮组织
130-098-373	Neonatal Heart Dissociation Kit, mouse and rat	25 tests	解离小鼠或大鼠新生鼠肿瘤组织
130-095-942	Brain Tumor Dissociation Kit (P), human	25 tests	解离人脑肿瘤组织(木瓜蛋白酶)
130-095-939	Brain Tumor Dissociation Kit (T), human	25 tests	解离人肿瘤组织(胰酶)
130-092-628	Neural Tissue Dissociation Kit (P)	50 tests	解离神经组织(木瓜蛋白酶)
130-093-231	Neural Tissue Dissociation Kit (T)	50 tests	解离神经组织(胰酶)
130-095-943	Neurosphere Dissociation Kit (P)	100 tests	解离神经球(木瓜蛋白酶)
130-095-944	Neurosphere Dissociation Kit (T)	100 tests	解离神经球(胰酶)
130-096-348	Embryoid Body Dissociation Kit, human and mouse	50 tests	解离人或小鼠拟胚体
130-094-802	Neural Tissue Dissociation Kit – Postnatal Neurons	50 tests	解离新生鼠神经组织
130-107-677	Adult Brain Dissociation Kit, mouse and rat	50 tests	解离小鼠或大鼠成年鼠脑组织

## 仪器安装及开机

### 一、仪器包装内容：

gentleMACS Octo Dissociator with Heaters 主机一台

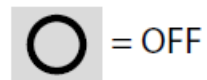
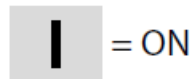
gentleMACS Heaters（加热模块）8 个

一根电源线

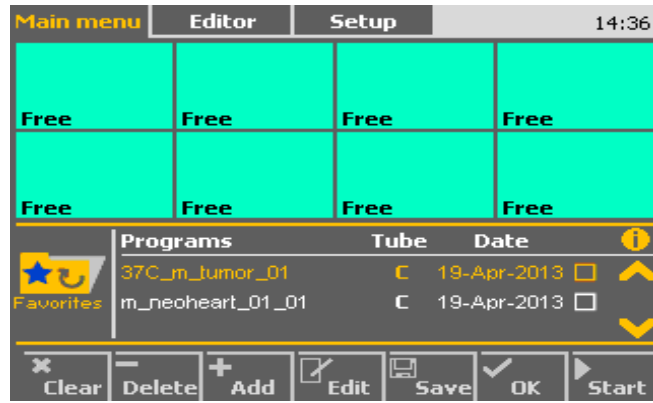
一本用户手册

### 二、仪器安装及开机

1. 小心从包装盒中取出设备
2. 将设备放置于一个稳定的平台上，避免阳光直射
3. 将电源线插入仪器背部的接口
4. 将仪器背部的电源开关拨至“ON”



5. 仪器将用数秒时间进行开机自检，之后进入主界面即可使用。



6. (可选) 需要时可取出加热模块，放在仪器的后面，备用。

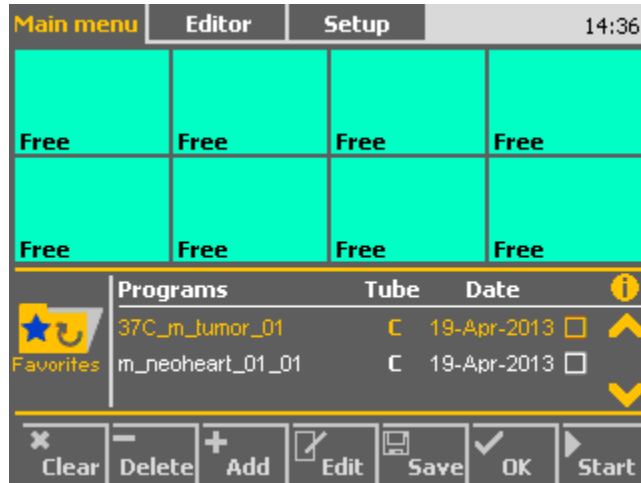


在需要酶孵育时，加热模块可使组织解离体系加热至 37 °C，保证酶活性最佳温度环境，达到高效的组织解离。每个通道配备 1 个加热模块，可分别独立运行。



# 仪器界面介绍

## 一、主菜单（Main menu）选项卡



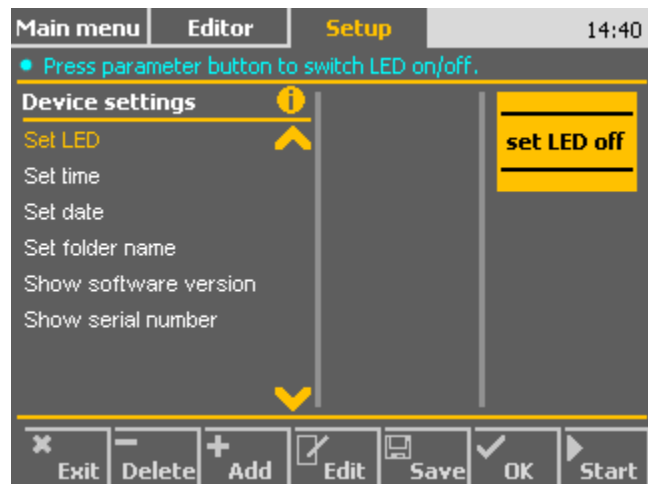
1. 主菜单界面显示了 8 个通道的状态、待选择的程序及操作按钮。
2. 每个通道可选择独立的组织解离程序。
3. 程序的选择：可以根据使用情况分别从 Miltenyi 文件夹、Favorites 文件夹、Templates 文件夹或 User 文件夹选择需要的程序。

## 二、编辑菜单（Editor）



1. 编辑菜单可以用来创建新的程序或者修改已有程序（非美天旋预设程序）；
2. 可在不同文件夹之间拷贝或移动程序；

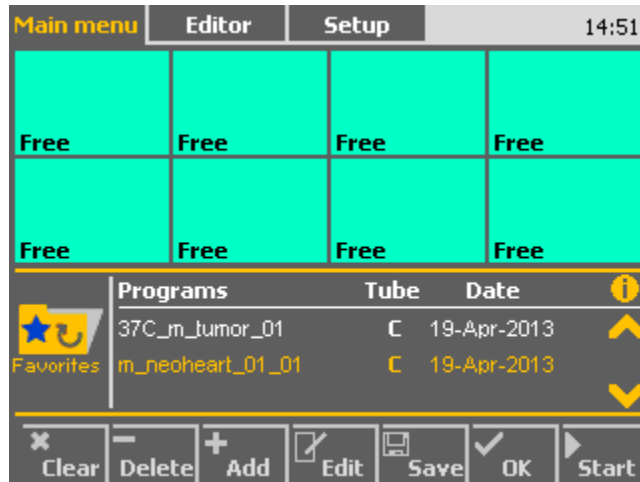
## 三、设置菜单（Setup）



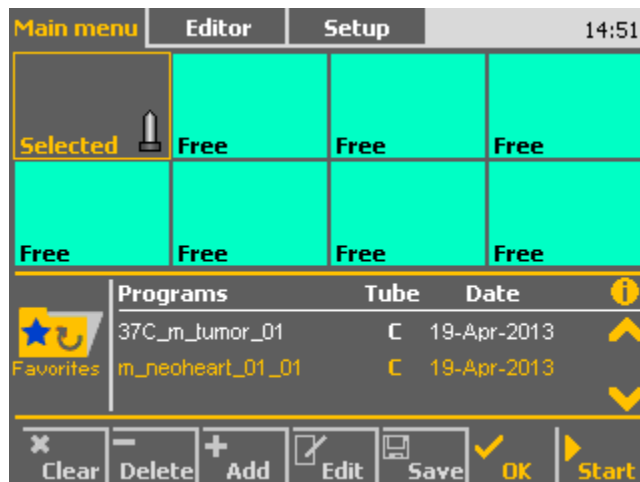
1. 该菜单下可以修改仪器的设置；
2. LED 灯的开关、时间的设置、文件夹的重命名等都在此文件夹下进行；

## 组织处理器的操作

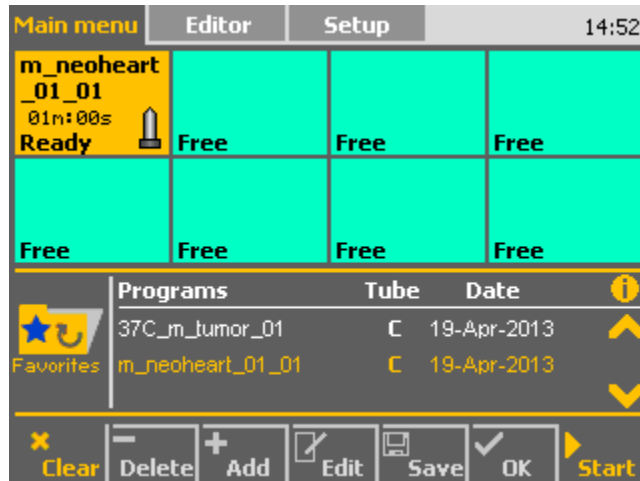
1. 在正常待机状态下，所有可用的通道将会显示 **Free**，表示各通道可随时加载样本，备用。



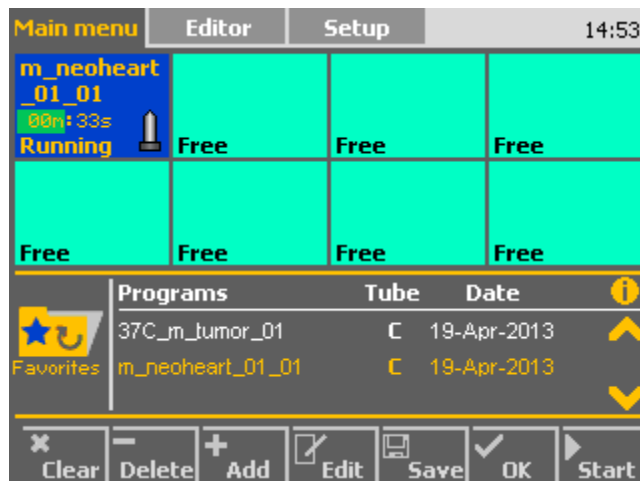
2. 将一个 C 管/M 管插入其中一个通道，仪器将自动检测到相应通道，并在主菜单界面的相应通道处显示 **Selected**。



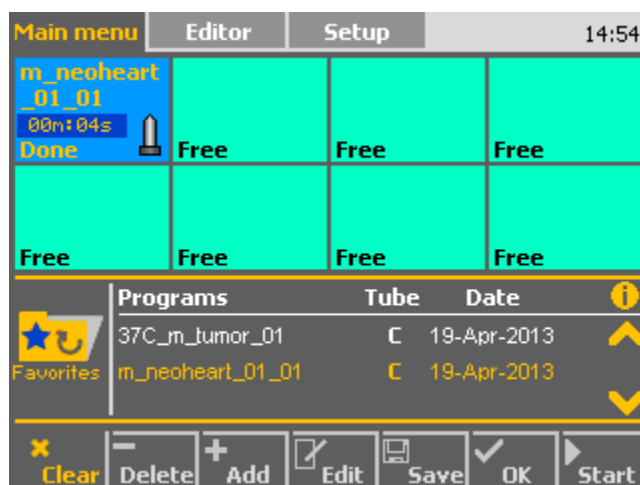
3. 如果所选程序需要 37 °C 加热功能，则将加热模块再插入当相应的通道中。
4. 选择将要使用的程序。
5. 点击右下角的 **OK** 以确认，此时操作界面状态显示为 **Ready**，并显示选定的程序名称及程序运行时间。



6. 点击右下角的 **Start** 以开始程序，此时界面状态将变为 **Running**，同时进度条开始倒计时。



7. 程序完成后，界面将显示 **Done**，进度条显示程序完成后经过的时间。



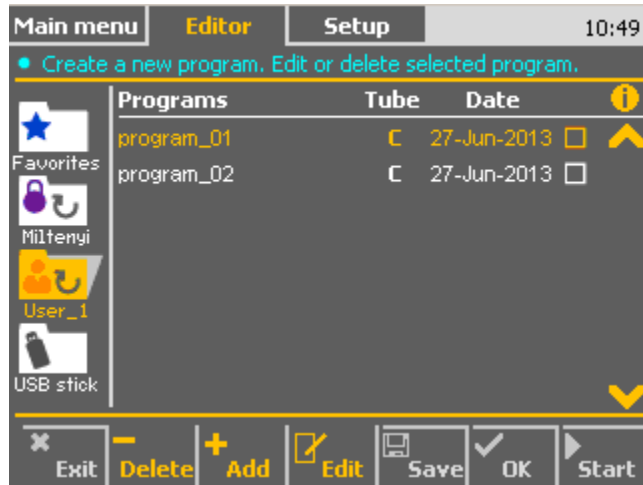
8. 移出 C 管/M 管，界面将重新显示 **Free**

**表 2：各通道状态概述**

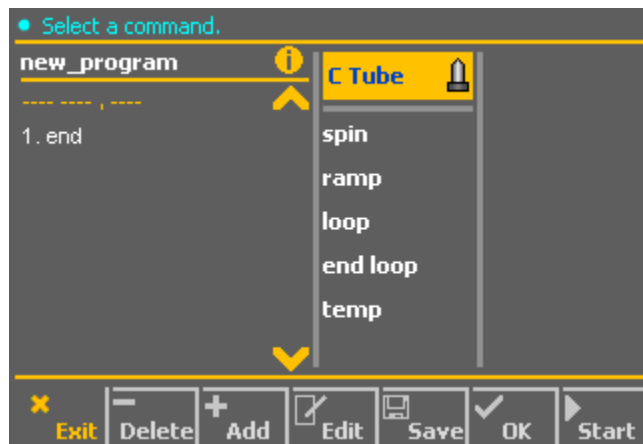
试管位置	状态	说明
1	Free	未插入样本 随时可以加载样本使用
2	Selected	已插入样本 插入样本后，即被仪器自动识别，状态变成“Selected”。此时可以选择相应的程序。
3	Selected	又插入一个样本，被选定。
4	Ready	样本已准备好。 已插入一个样本，并指定好程序，选择“OK”。按下“Start”键后即可运行程序，同时显示程序名称和运行时间。
5	Running	正在运行程序。 时间显示的是该程序运行完还需要的时间。
6	Done	程序结束。 时间显示的是程序结束后过去的时间。
7	Aborted	程序被停止。 程序运行时可以随时停止。时间显示的是自程序停止时距离程序结束还需要的时间。
8	Stand by	未选定样本。 插入样本后会自动显示状态“Selected”。在触摸屏上触碰样本所在的位置，状态会改为“Stand by”。注意，当状态为“Stand by”时，不能对样本指定运行程序。

## 创建新程序

1. 在 Editor 菜单的左侧选择一个 User 文件夹



2. 点击 **Add**，一个新的程序文件模板将显示出来



3. 首先选择 C 管或者 M 管。
4. 根据需要，选择 spin、ramp、loop 等，点击 **Add**。
5. 选择输入所需的参数，点击 **OK**。

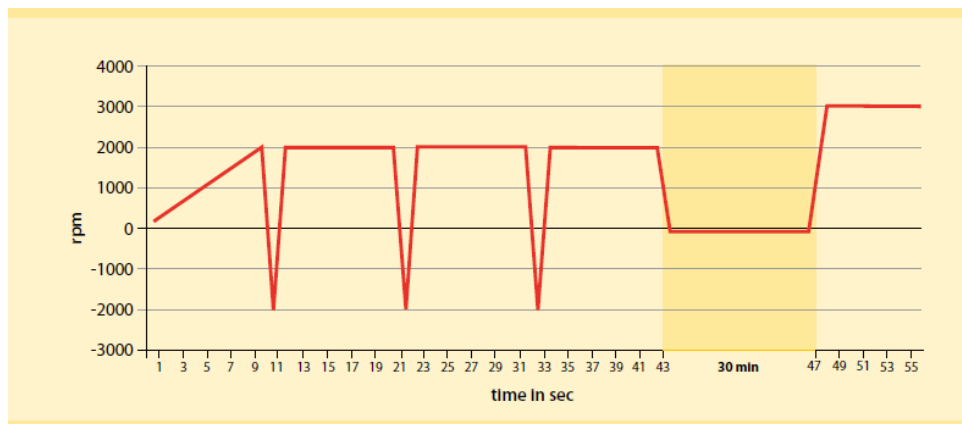
表 3: 程序指令含义

指令	说明
temp ON	定义孵育开始时间： 任何介于 temp ON 和 temp OFF 之间的指令都会在 37°C 执行。
temp OFF	定义孵育结束时间： 该指令表示结束加热功能。

spin	<p>定义旋转速度 (rpm)、旋转方向 (+/-) 和旋转时间(min/s):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 顺时针: +200 ~ +4000 rpm</li> <li>• 逆时针: -200 ~ -4000 rpm</li> </ul>
ramp	<p>定义达到某一旋转速度所需要的时间:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 如果以 ramp 程序开始, 表示起始速度为 0 rpm</li> <li>• 如果在 spin 后加上 ramp 程序, 则起始速度为 spin 的速度</li> <li>• 最大加速度不能超过 6000 rpm/s</li> </ul>
loop	<p>定义开始循环:</p> <p>对 loop 和 end loop 之间的指令进行循环, 并指定循环数。</p> <p>最多不能超过 200 个循环。</p>
end loop	<p>定义结束循环:</p> <p>必须加入循环指定中, 是循环的最后一个步骤</p>

## 编程操作练习

### 【自定义程序】



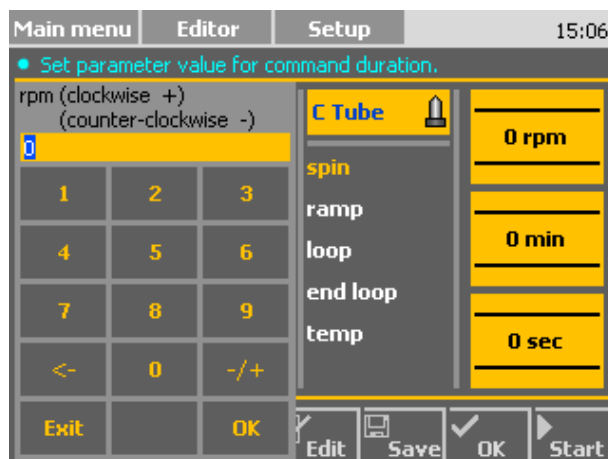
1. ramp 2,000 rpm, 10''
2. loop 3×
3. spin -2,000 rpm, 1''
4. spin 2,000 rpm, 10''
5. end loop
6. temp ON
7. spin -20 rpm, 30'
8. spin 3,000 rpm, 10''

9. temp OFF

10. end

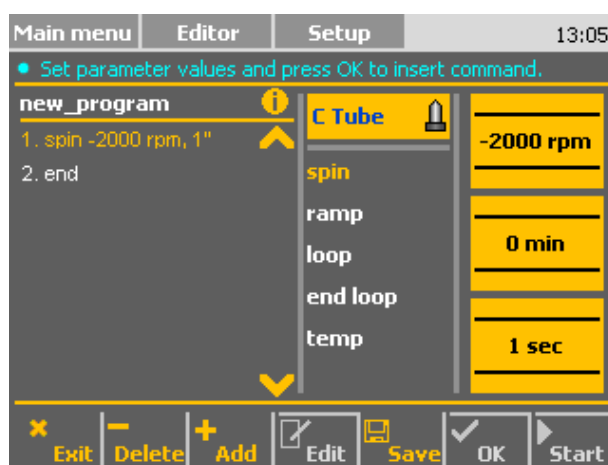
### 【操作步骤】

1. 点击 spin，在弹出的键盘中输入速度（rpm）及时间（min 和 sec）



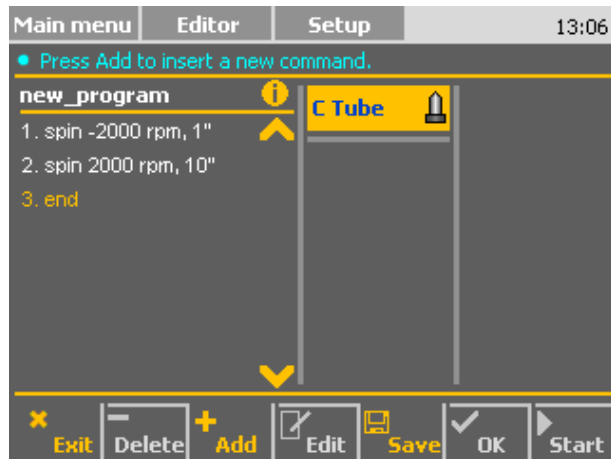
2. 点击 OK 确认或者 Exit 取消

3. 此例中，选择 spin，输入-2000 rpm，1”

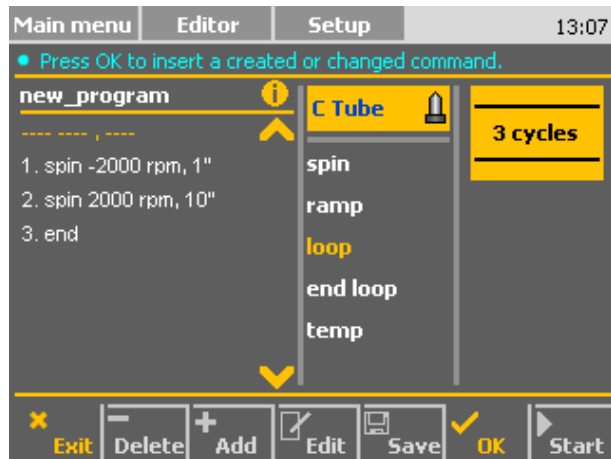


4. 选择 Add 插入下一个命令或者 Save 以命名及保存程序。此例中，点击 spin 输入 2000 rpm 10sec

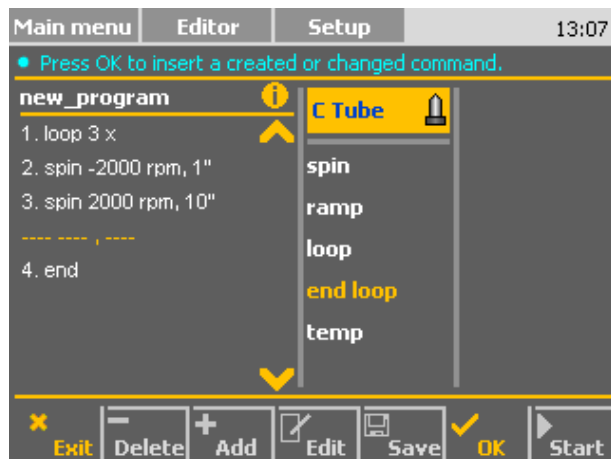




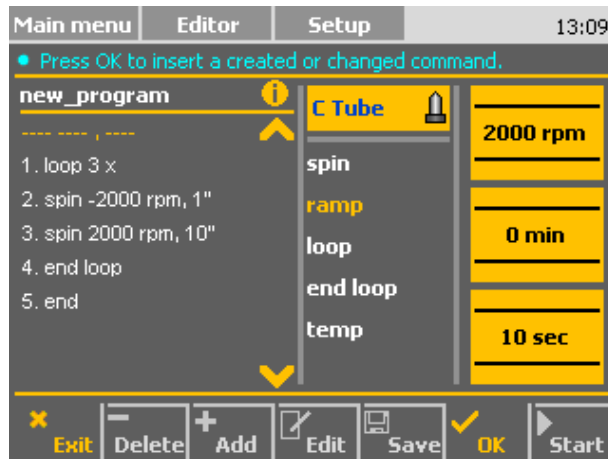
5. 选择第一条命令，点击 Add，选择 loop 以标记重复命令开始的位置，依本例，输入 3 表示重复的次数



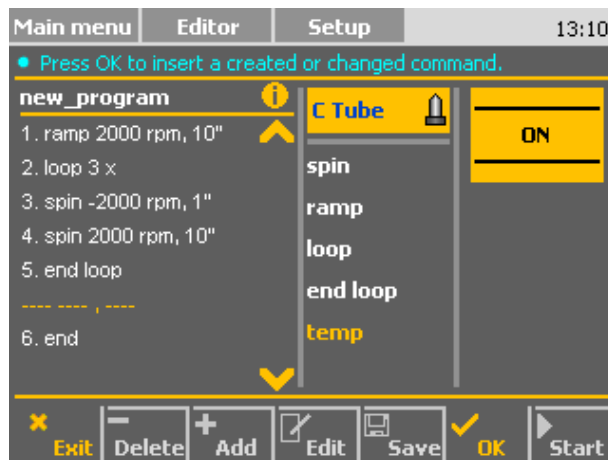
6. 点击 OK 以确认
7. 选择 end 指令，点击 Add 后选择 end loop 来结束程序循环，点击 OK 确认。



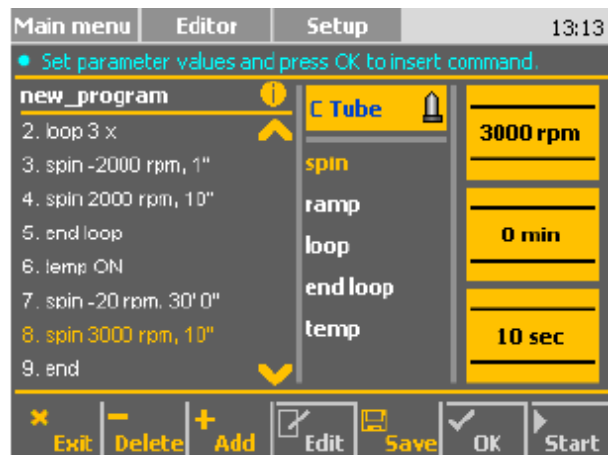
8. 再次选择第一条命令后，点击 Add，选择需要的命令及输入相应的参数，最后完成整个程序的编辑。
9. 此例中，选择 ramp，输入 2000 rpm, 10 sec。



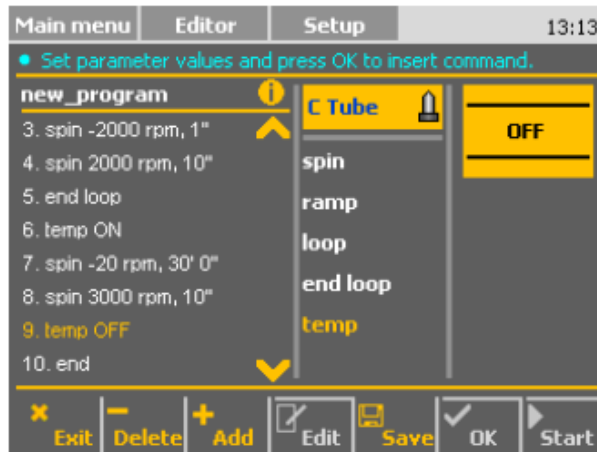
10. 选择 end 指令，点击 Add 后选择 temp 和 ON，开启加热功能，点击 OK 确认。



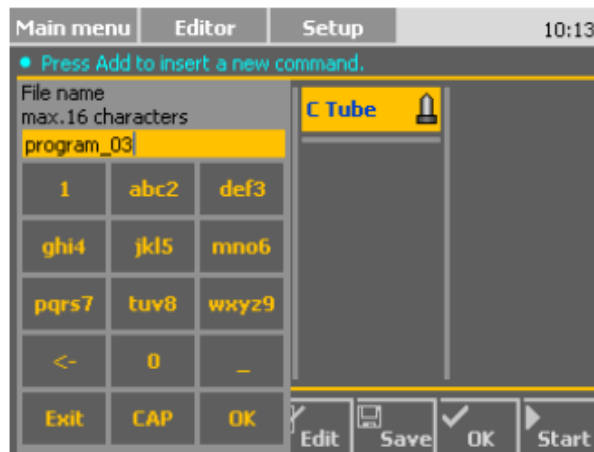
11. 选择 end 指令，点击 Add。此例中，加入了 2 个 spin 指令，spin -20 rpm, 30 min 和 spin 3000 rpm, 10 sec。



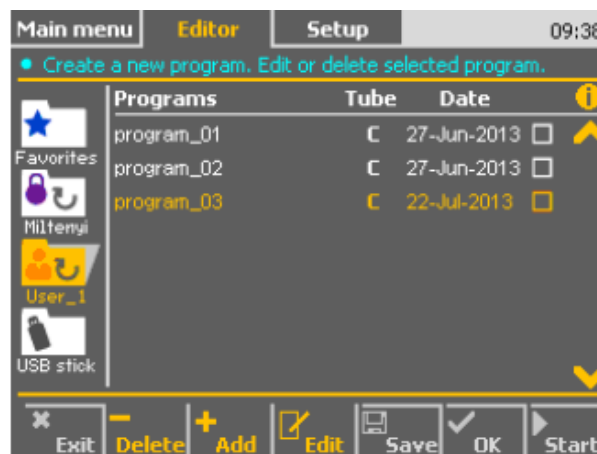
12. 选择 end 指令，点击 Add。选择 temp 和 OFF，关闭加热功能，点击 OK 确认。



13. 点击 Save 保存新程序，输入文件名 Program\_03（注意：文件名不能超过 16 个字母）。



14. 点击 OK，将程序保存到相应的文件夹。此例中，新程序自动保存到 User\_1 文件夹中。



注意：每个程序不能超过 3,200 转。例如，若转速是 4,000 rpm，持续时间不能超过 48 秒；若转速是 200 rpm，最长可运行 960 秒，即 16 分钟。

## 仪器程序升级

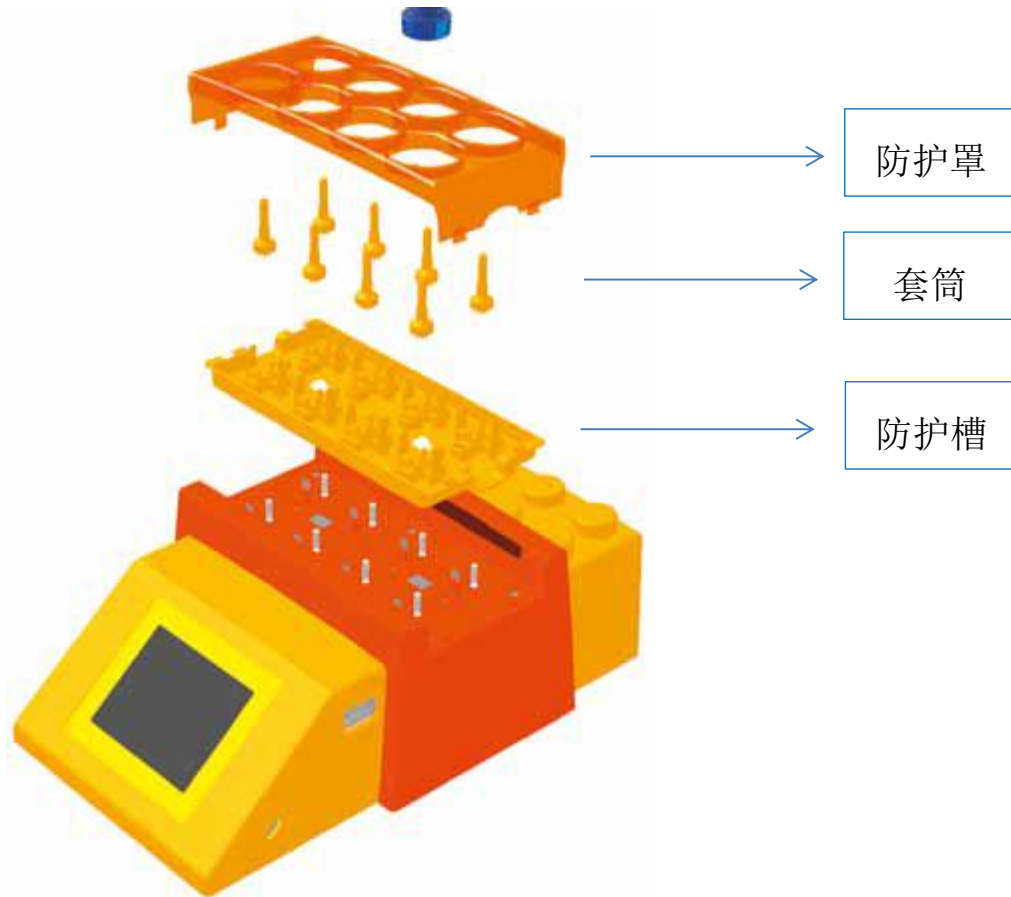
1. 在美天旎的官方网站 [www.miltenyibiotec.com.cn](http://www.miltenyibiotec.com.cn) 找到程序升级界面，填入仪器的序列号及用户信息，用户的注册邮箱将收到新的程序包
2. 准备一个 U 盘，将程序包解压至 U 盘根目录
3. 关闭仪器电源，将 U 盘插入仪器侧面的 USB 接口



4. 打开仪器电源，按照菜单界面弹出框进行操作，程序升级将自动进行。
5. 完成后拔出 U 盘，新的程序已经写入仪器。

## 仪器的清洁维护

1. 清洁仪器前请拔掉电源线。
2. 移出防护罩。
3. 移出套筒进行清洁或消毒。
4. 移出防护槽进行清洁。



5. 仪器表面可用含有去污剂的水溶液或者 70%乙醇擦拭。
6. 加热模块可用含有 70%乙醇的软布擦拭，不要使用去污剂，不要浸泡于清洁剂中。
7. 清洁完成后，按顺序组装各组件。

## 示例：人肿瘤组织解离

### 【实验目的和原理】

通过将机械破碎法和酶消化法相结合，将人肿瘤组织制备成单细胞悬液。gentleMACS™ 组织处理器主要发挥机械破碎作用，而肿瘤解离试剂盒则含有多种酶，用于消化细胞外基质。组织解离后用滤器过滤样本，以去除样本中残存的组织，从而获得高质量的单细胞悬液。获得的细胞可立即用于后续实验，如细胞分选、细胞培养、细胞或分子分析。

### 【实验试剂及耗材】

1. RPMI 1640 或 DMEM
2. MACS SmartStrainer 滤器 (70 μm) (货号: 130-098-462)
3. gentleMACS C 管 (货号: 130-093-237 或 130-096-334)
4. 人肿瘤组织解离试剂盒 (货号: 130-095-929)
5. (可选) MACS 组织保存液 (货号: 130-100-008)
6. (可选) 红细胞裂解液 (10×) (货号: 130-094-183)

### 【解离试剂盒试剂实验前准备】

1. 配制 Enzyme H 溶液: 向每瓶 Enzyme H 冻干粉各加入 3 mL RPMI 1640 或 DMEM。混匀，分装后冻存于-20℃，避免反复冻融。Enzyme H 溶液在-20℃可稳定保存 6 个月。如果在组织解离后进行细胞培养，则应在分装前无菌过滤。
2. 配制 Enzyme R 溶液: 向 Enzyme R 冻干粉加入 2.7 mL RPMI 1640 或 DMEM。混匀，分装后冻存于-20℃，避免反复冻融。Enzyme R 溶液可在-20℃稳定保存 6 个月。注意：在使用前彻底混匀。
3. 配制 Enzyme A 溶液: 向 Enzyme A 冻干粉加入 1 mL Buffer A。禁止剧烈振荡。将配制好的酶溶液分装，保存于-20℃，避免反复冻融。该溶液可在-20℃稳定保存 6 个月。

### 【实验操作】

1. 向 gentleMACS C 管中加入 4.7 mL RPMI 1640 或 DMEM、200 μL Enzyme H、100

μL Enzyme R 和 25 μL Enzyme A，配制成混合酶溶液。

2. 将肿瘤组织剪成 2-4 mm 大小的小块，尽量剪去肿瘤组织样本的脂肪、纤维和坏死组织。
3. 将组织块放入装有混合酶溶液的 gentleMACS C 管中
4. 拧紧 C 管，倒置，安装到 gentleMACS 组织处理器的套管中；确保样本处于转子/定子之间的区域。
5. 插入加热模块。
6. 根据肿瘤类型，选择并运行相应的肿瘤组织解离程序：

肿瘤类型	程序	肿瘤举例
质地柔软的肿瘤组织	<b>37C_h_TDK_1</b>	黑色素瘤、卵巢癌、结肠癌和下咽癌
质地中等的肿瘤组织	<b>37C_h_TDK_2</b>	肺癌和前列腺癌
质地坚硬的肿瘤组织	<b>37C_h_TDK_3</b>	乳腺癌、胰腺癌、肝癌以及头颈部鳞状细胞癌（HNSCC）

7. 程序结束后，取下 C 管。
8. 将 C 管短暂离心，使所有样本组织都沉到试管底部。
9. 重悬样本，用 SmartStrainer 滤器（70 μm）过滤，50 mL 试管收集细胞悬液。
10. 用 20 mL RPMI 1640 或 DMEM 冲洗 SmartStrainer 滤器（70 μm）。
11. 将细胞悬液 300×g 离心 7 分钟，彻底弃去上清。
12. 重悬细胞至所需体积，用于下游实验。
13. 如要去除红细胞或死细胞，采用 1× 红细胞裂解液裂红，或密度梯度离心法。

## 示例：小鼠肺脏组织解离

### 【实验目的和原理】

通过将机械破碎法和酶消化法相结合，将小鼠肺组织制备成单细胞悬液。gentleMACS™ 组织处理器主要发挥机械破碎作用，而小鼠肺脏解离试剂盒则含有多种酶，用于消化细胞外基质。组织解离后用滤器过滤样本，以去除样本中残存的组织，从而获得高质量的单细胞悬液。获得的细胞可立即用于后续实验，如细胞分选、细胞培养、细胞或分子分析。

### 【实验试剂及耗材】

1. gentleMACS C 管（货号：130-093-237 或 130-096-334）
2. MACS SmartStrainer 滤器（70 μm）（货号：130-098-462）
3. 小鼠肺脏解离试剂盒（货号：130-095-927）
4. PBS 缓冲液
5. PEB 缓冲液：由 PBS (pH 7.2)、0.5% BSA 和 2 mM EDTA 组成。也可将 MACS BSA 储存液（货号：130-091-376）与 autoMACS® 冲洗液（货号：130-091-222）以 1:20 混合稀释得到。放置低温（2-8℃）保存。

### 【解离试剂盒试剂实验前准备】

1. 配制 1×Buffer S：向 19 mL 无菌双蒸水加入 1 mL 20×Buffer S。2-8℃ 保存。
2. 配制 Enzyme D 溶液：向 Enzyme D 冻干粉中加入 3 mL 1×Buffer S。混匀，分装后冻存于-20℃，避免反复冻融。如果在组织解离后进行细胞培养，则应无菌过滤后再分装保存。
3. 配制 Enzyme A 溶液：向 Solution 2 冻干粉中加入 1 mL 1×Buffer S。不要剧烈振荡。分装后冻存于-20℃。避免反复冻融。

### 【实验操作】

一只小鼠肺脏大约需要 2.5 mL 酶溶液消化。一只小鼠肺脏约重 110-150 mg（雌性 BALB/c 小鼠，6-7 周）。

1. 向 gentleMACS C 管中加入 2.4 mL 1×Buffer S、100 μL Enzyme D 和 15 μL



Enzyme A，配制成混合酶溶液。

2. 剪下小鼠肺脏，放入培养皿中，用 pH 7.2 PBS 冲洗肺叶，以去除残留的血液。确保去除与肺脏相连的胸腺、心脏、输入和输出淋巴管，气管及结缔组织。
3. 向装有混合酶溶液的 gentleMACS C 管中加入 1 只小鼠的所有肺叶。
4. 拧紧 C 管，倒置，安装到 gentleMACS 组织处理器的套管中；确保样本处于转子/定子之间的区域。
5. 插入加热模块。
6. 选择并运行 **37C\_h\_LDK\_1** 程序。
7. 程序结束后，取下 C 管。
8. 将 C 管短暂离心，使所有样本组织都沉到试管底部。
9. 重悬样本，用 SmartStrainer 滤器（70  $\mu\text{m}$ ）过滤，15 mL 试管收集细胞悬液。
10. 用 2.5 mL 1x Buffer S 冲洗 SmartStrainer 滤器（70  $\mu\text{m}$ ）。
11. 弃去滤器，将细胞悬液 300 $\times$ g 离心 10 分钟，彻底弃去上清。
12. 用培养基或适当的溶液重悬细胞至所需体积，用于下游实验。

## 示例：小鼠脾脏解离

### 【实验试剂及耗材】

1. gentleMACS C 管（货号：130-093-237 或 130-096-334）
2. MACS SmartStrainer 滤器（30  $\mu\text{m}$ ）（货号：130-098-458）
3. PEB 缓冲液：由 PBS(pH 7.2)、0.5% BSA 和 2 mM EDTA 组成。也可将 MACS BSA 储存液（货号：130-091-376）与 autoMACS<sup>®</sup> 冲洗液（货号：130-091-222）以 1:20 混合稀释得到。放置低温（2-8 $^{\circ}\text{C}$ ）保存。

### 【实验操作】

一只小鼠脾脏约重 80-120 mg（雌性 BALB/c 小鼠，6-7 周）。

1. 向 C 管中加入小鼠脾脏和 PEB 缓冲液：

1-2 只小鼠脾脏	3 mL
3-4 只小鼠脾脏	6 mL
5-6 只小鼠脾脏	9 mL

2. 拧紧 C 管，倒置，安装到 gentleMACS 组织处理器的套筒中。确保样本材料位于转子/定子所在的区域。
3. 根据脾脏数量选择并运行程序：

1-2 只小鼠脾脏	<b>m_spleen_01</b>
3-6 只小鼠脾脏	<b>m_spleen_04</b>

4. 程序结束后，从 gentleMACS 组织处理器上取下 C 管。
5. （可选）短暂离心，使样本组织沉到试管底部。
6. 重悬样本，用 SmartStrainer 滤器（30  $\mu\text{m}$ ）过滤细胞悬液，然后用 15 mL 试管（每个 C 管 1-2 只小鼠脾脏）或 50 mL 试管（每个 C 管 3-6 只小鼠脾脏）收集细胞悬液。
7. 用 5 mL PEB 缓冲液冲洗 SmartStrainer 滤器（30  $\mu\text{m}$ ）。
8. 弃去滤器，将细胞悬液 300 $\times$ g 室温离心 10 分钟，彻底弃去上清。
9. 用缓冲液重悬细胞至所需体积。