

# Collagenase IV

REF: EG25308-S/M

## 储存条件

4°C避光保存 2 年

## 产品组成

组分	规格 S	规格 M
Collagenase IV	100 mg	1 g

## 产品简介

胶原酶 (Collagenase) 来源于溶组织梭菌 (*Clostridium histolyticum*), 是一种蛋白酶, 能够特异性的识别 Pro-X-Gly-Pro 序列并切割该序列中性氨基酸 (X) 和甘氨酸 (Gly) 之间的肽键, 并且这种序列在胶原中出现的频率很高。胶原酶是唯一的一种可以降解广泛存在于结缔组织中的具有三股螺旋的天然胶原纤维的蛋白酶。

本品为 IV 型胶原酶,  $\geq 125$  U/mg solid, 具有低胰酶活性, 特别适用于胰岛细胞制备。

## 活性定义

1 个酶活力单位指在 37°C, pH7.5 的条件下, 5 h 内水解胶原产生 1  $\mu$ mol L-亮氨酸所需的酶量。

## 使用方法

### 一、胶原酶储存液的配制

向每管 100 mg 的胶原酶中加入 1 ml 的相应缓冲液 (根据特定的实验条件或者参考相应的文献资料确定), 如 HBSS (Hank's 平衡盐溶液, 含  $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ ) 等, 轻轻旋涡震荡使其充分溶解, 制备成 100 mg/ml (即 100 $\times$ ) 的储存液。用低蛋白结合性的 0.22  $\mu$ m 的滤膜过滤除菌, 分装成小份量, 于 -20°C 避光冻存。

注: 本品为粗提制品, 溶解后体系中可能存在少量不溶性杂质, 该类不溶物不影响产品生物活性, 可正常使用。如果需要制备无菌溶液, 建议先 4°C 12000~15000 g 离心 5~10 min 取上清后再用 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤除菌或者先用 0.8  $\mu$ m 滤膜过滤后再用 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤除菌, 避免滤膜堵塞。

使用前于冰上解冻, 避免反复冻融。其用于组织和细胞分散的常用浓度为: 0.5~2.5 mg/ml, 用于软骨消化的常用浓度为 1~2 mg/ml, 需要根据特定的实验条件或者参考相应的文献资料确定所需的最佳工作浓度。

## 二、组织的分离

1. 使用无菌手术刀或剪刀将组织切成 3~4 mm 大小的组织块;
2. 使用相应缓冲液 (如 HBSS) 洗涤组织块数次;
3. 加入足量的缓冲液, 使其浸没组织块, 并加入胶原酶至需要的工作浓度;
4. 于 37°C 孵育 4~18 h。消化时使用水平摇床以及用 3 mM 的  $CaCl_2$  补充消化可以提高消化效率;
5. 已分散开的细胞可使用不锈钢或尼龙网筛筛得, 收集备用。未完全解离的组织另外添加适量的新鲜胶原酶工作液于 37°C 继续孵育;
6. 使用不含胶原酶的缓冲液洗涤收集的细胞数次;
7. 细胞培养液重悬上述细胞, 利用自动细胞计数器或其他方法计算活细胞密度;
8. 于细胞培养皿上利用合适细胞培养基接种细胞。

## 三、器官灌注

1. 向 37°C 预热的相应缓冲液 (如 HBSS) 中加入胶原酶, 另添加 3 mM 的  $CaCl_2$  有助于提高分离效率;
2. 按照已优化的速率对相应的器官灌注胶原酶工作液;
3. 将上述过程中回收的灌注液流经不锈钢或尼龙网筛, 从而将已解离的细胞或小片段组织块与较大团块分离开来, 未充分解离的组织需利用新鲜胶原酶工作液于 37°C 进一步孵育;
4. 使用不含胶原酶的缓冲液洗涤收集的细胞数次;
5. 细胞培养液重悬上述细胞, 利用自动细胞计数器或其他方法计算活细胞密度;
6. 于细胞培养皿上利用合适细胞培养基接种细胞。