

大鼠肝枯否细胞分离培养试剂盒

产品货号：P-CA-613

产品规格：3Tests/10Tests

一、产品描述

本试剂盒专为提取原代大鼠肝枯否细胞开发，采用混合酶低温消化后密度梯度分离、差速贴壁方法纯化得到大鼠肝枯否细胞，经实验室验证，每次实验（1 Test）能够分离 1×10^6 个目的细胞，经免疫荧光鉴定，细胞纯度（CD68 阳性率）>90%。

二、适用范围

本产品适用于从 14-84 日龄的 Wistar、SD 等不同品系的大鼠中提取肝枯否细胞。每次实验取用 1-2 只 14-28 日龄或者 1 只 35-84 日龄的大鼠完整肝组织，组织经消化、分离、铺板纯化 48 h 后可获得肝枯否细胞量 $>1 \times 10^6$ cells，肝枯否细胞属于终末分化细胞，不增殖，分离后细胞可培养 1 周左右。

注：具体的细胞量可能因取材获得的组织大小和数量不同而有所变化。

三、试剂盒组成成分

本试剂盒组成成分如下表

表 1：大鼠肝枯否分离试剂盒组成成分及相应信息

成分名称	产品规格	性状	储存条件
大鼠肝枯否细胞专用清洗液 Specialized Cleaning Solution For Rat Kupffer Cells	3Tests (250 mL) 10Tests (500 mL×2)	淡黄色澄清液体	2-8°C，有效期一年
大鼠肝枯否细胞组织消化酶稀释液 Dilution Of Digestive Enzyme For Rat Kupffer Cells	3Tests (60 mL) 10Tests (200 mL)	红色澄清液体	2-8°C，有效期一年
大鼠肝枯否细胞组织消化酶 Tissue Digestive Enzyme For Rat Kupffer Cells	3Tests (6 mL) 10Tests (20 mL)	棕色澄清液体	-5~-20°C，有效期一年
大鼠肝枯否细胞专用分离液A Special Separation Solution A For Rat Kupffer Cells	3Tests (20 mL) 10Tests (75 mL)	无色澄清液体	2-8°C，有效期一年
大鼠肝枯否细胞专用分离液B Special Separation Solution B For Rat Kupffer Cells	3Tests (20 mL) 10Tests (75 mL)	无色澄清液体	2-8°C，有效期一年
大鼠肝枯否细胞专用分离液C Special Separation Solution C For Rat Kupffer Cells	3Tests (10 mL) 10Tests (30 mL)	无色澄清液体	2-8°C，有效期一年
100 μm 细胞滤网 100 μm Cell Filter	3Tests (3个) 10Tests (10个)	绿色	常温，有效期三年
70 μm 细胞滤网 70 μm Cell Filter	3Tests (3个) 10Tests (10个)	橙色	常温，有效期三年
大鼠肝枯否细胞基础培养基 Basic Culture Medium For Rat Kupffer Cells	3Tests (100 mL) 10Tests (300 mL)	红色澄清液体	2-8°C，有效期一年

网站: www.procell.com.cn

电话: 400-999-2100

邮箱: techsupport@procell.com.cn

地址: 湖北省武汉市高新大道858号生物医药产业园三期C4栋



续表 1: 大鼠肝枯否分离试剂盒组成成分及相应信息

成分名称	产品规格	性状	储存条件
大鼠肝枯否细胞添加剂 Supplement For Rat Kupffer Cells	3Tests (10 mL) 10Tests (30 mL)	黄色澄清液体	-5~-20℃, 有效期一年

注: 各成分请根据试剂管上标签进行表示温度保存。消化液解冻后保质期仅一个月, 建议初次使用试剂盒后将消化液按照说明书用量进行分装, 冻存于-20℃冰箱内, 使用时再次解冻, 避免反复冻融。

四、注意事项

1. 实验需自备解剖板、0.25%胰蛋白酶消化液、冰盘/冰盒、手术器械(含 2 个眼科剪、2 个手术直镊、1 个手术弯镊); 组织处理皿(玻璃皿、6 cm/10 cm 都可)、6 cm 培养皿、15 mL/50 mL 离心管若干。
2. 建议初学者在正式实验前提前使用 1-2 只鼠进行解剖模拟操作, 提升解剖熟练度。
3. 全程分离操作过程建议在冰上进行, 注意不要让组织和液体由于温度过低而结冰。
4. 培养基中含有微生物生长所需的营养成分, 请在超净工作台内打开, 按照所需要量分装, 并且用封口膜封住瓶口, 即取即用, 以避免污染。
5. 本试剂盒中的分离液在储存过程中可能会出现瓶口析出晶体颗粒物、溶液变浑浊的情况, 属于正常现象, 可放心使用。

五、操作流程

(一) 实验前准备:

1. 试剂解冻复温: 大鼠肝枯否细胞组织消化酶、大鼠肝枯否细胞培养基添加剂 4℃ 冰箱解冻; 大鼠肝枯否细胞专用清洗液、大鼠肝枯否细胞组织消化酶稀释液、大鼠肝枯否细胞专用分离液 A、大鼠肝枯否细胞专用分离液 B、大鼠肝枯否细胞专用分离液 C、大鼠肝枯否细胞基础培养基恢复至室温。
2. 大鼠肝枯否细胞完全培养基配制: 将 5 mL 大鼠肝枯否细胞添加剂加入 50 mL 大鼠肝枯否细胞基础培养基, 混匀后待用。
注: 大鼠肝枯否细胞完全培养基保存条件: 2-8℃, 有效期: 3 个月。配置完全培养基时可根据使用量进行配置, 剩余添加剂需按照比例进行分装后, 置于-20℃冰箱内保存, 避免反复冻融。
3. 大鼠肝枯否细胞组织消化工作液配置: 将 2 mL 大鼠肝枯否细胞组织消化酶加入 18 mL 大鼠肝枯否细胞组织消化酶稀释液, 混匀后待用。
4. 使用过量戊巴比妥注射处死大鼠, 于 75%酒精中浸泡灭菌, 消毒后将动物转运至超净工作台内。

(二) 解剖操作:

1. 准备工作: 将两个干净孔板放在超净台内, 将眼科剪 1、直镊 1, 眼科剪 2、直镊 2、眼科剪 3、弯镊 1 从左向右依次放置在孔板上方, 注意将眼科剪和镊子成对放置, 前方约三分之一部位悬空, 使用完成后将剪镊放回原有位置, 相互不触碰, 防止污染。



2. 在超净工作台内，使用针头对实验鼠进行仰卧固定。
3. 取材操作：取材操作：用眼科剪 1 沿腹中线纵向剪开腹胸部皮肤，直镊 1 沿开口处提起皮肤，眼科剪 1 向四肢方向横向剪开皮肤，向两侧钝性剥开皮肤与皮下组织，暴露腹壁浅肌层，使用直镊 1 将皮肤拉向两侧。换取另一套眼科剪 2、直镊 2，剪开腹膜，充分暴露肝脏组织，眼科剪 2 剪除肝脏周围结缔组织和血管，取出完整的肝脏组织，将组织放于玻璃培养皿内，培养皿内预先加入**大鼠肝枯否细胞专用清洗液**以浸没组织。

(三) 组织处理及消化：

1. 组织清洗：换用一套新眼科剪 3、弯镊 1，弯镊 1 夹住肝叶连接处，轻轻抖动肝组织，此时有血污流出，吸取皿内液体，加入新的**大鼠肝枯否细胞专用清洗液**将组织漂洗 2-3 遍，使用剪镊清理肝脏周围血污、胆管、血管，获得纯净组织，将组织转移至新玻璃培养皿内，培养皿内预先加入**大鼠肝枯否细胞专用清洗液**至浸润组织为止。
2. 组织处理：将获得的纯净组织转移至新的培养皿内，将皿提起大概 45°角左右，用弯镊 1 将组织拨向最底处，加入少许**大鼠肝枯否细胞专用清洗液**至刚好没过组织为宜，用眼科剪 3 将组织快速剪成 1 mm³ 碎块，剪至组织呈砂糖状，无大块组织为止（如图 1 所示），加入**大鼠肝枯否细胞专用清洗液**，将组织块吹散，用巴氏管或者宽口吸头吸取组织悬液转移至 50 mL 离心管内，加入 5 mL **大鼠肝枯否细胞专用清洗液**重悬组织碎块，经 300 g，离心 1 min，丢弃上清，保留组织沉淀。
3. 组织消化：向离心管内加入 20 mL **大鼠肝枯否细胞专用消化液**，吹打混匀，拧紧瓶口、缠上封口膜，确保不漏液，倾斜 45°放置使得组织碎块能够完全接触消化液，4°C 消化，消化时间：**16 h**（消化时间请勿超过 16 h，过度消化后对细胞活率会产生明显影响）。
4. 消化完成后取出离心管，转移至 37°C 水浴摇床复温消化，转速 150 rpm，复温消化时间为 15 min。
5. 在超净台中，将 **100 μm 细胞滤网**、**70 μm 细胞滤网** 分别放置在一个 50 mL 离心管上，用 1-2 mL **大鼠肝枯否细胞专用清洗液** 润洗滤网。
6. 细胞过滤：取出离心管，在超净台中打开，用 5 mL 枪头吹打组织悬液 30 次以上，加入 5 mL **大鼠肝枯否细胞专用清洗液** 稀释，吸取此时的细胞悬液，依次经 **100 μm 细胞滤网**、**70 μm 细胞滤网** 过滤，收集滤液。

(四) 细胞分离纯化及培养：

1. 将上述步骤中得到的细胞滤液 400 g 离心 10 min，丢弃上清，保留沉淀。
2. 用 6 mL **大鼠肝枯否细胞专用分离液 A** 重悬沉淀，离心管经离心机：900 g，离心 15 min。
3. 取一支新的 15 mL 离心管，加入 3 mL **大鼠肝枯否细胞专用分离液 C**，备用。
4. 离心完成后，取出离心管，吸弃上清（上清为肝星状细胞，少量肝窦内皮、肝枯否、肝实质细胞），保留沉淀。用 6 mL **大鼠肝枯否细胞专用分离液 B** 重悬沉淀。



5. 倾斜步骤 3 中准备的 15 mL 离心管，使用 1 mL 移液枪吸取细胞悬液，吸头抵住 15 mL 管壁，轻柔打出细胞悬液，使其沿管壁缓慢加入到大鼠肝枯否细胞专用分离液 C 上方液面（如图 2 所示），令二者形成液面分层（如图 3 所示）。

注：若不能确保能够使两种分离液产生分层，可用 200 μ L 枪头吸取重悬后的细胞悬液按上述操作先打入 5-6 枪左右，待看见明显的液面分层后，再使用 1 mL 枪头加入剩余的悬液，液面分层可在灯光下观察，能看见两种分离液之间有明显的分界线。

6. 离心管经离心机：900 g，离心 15 min（设置升速为 1、降速为 0）；离心后可见液体分 5 层，从上到下依次为：2-5 mm 厚的肝星状与肝实质细胞层、6 mL 分离液 B 层、2-3 mm 厚的肝窦内皮、肝枯否混合细胞层（以下简称白膜层）、3 mL 分离液 C 层、2-5 mm 厚的红细胞沉淀层（如图 3 所示）。

7. 吸弃最上层细胞层，使用 1 mL 移液枪，枪头伸到白膜层上方，小心吸取第三层的白膜层的细胞于新的无菌 15 mL 离心管中，加入 5 mL 大鼠肝枯否细胞专用清洗液重悬白膜层悬液，经离心机 1600 rpm，离心 5 min，丢弃上清，保留沉淀。

8. 用 5 mL 大鼠肝枯否细胞专用完全培养基重悬沉淀，接种到新的培养皿中。

9. 37°C、5% CO₂ 培养 25 min 后，吸取培养上清，更换为新鲜大鼠肝枯细胞专用完全培养基，上清液转移至全新的培养皿内 37°C、5% CO₂ 培养 25 min。

10. 将转移后的上清液再次转移到新皿内，原皿添加新鲜大鼠肝枯否细胞专用完全培养基，重复此转移流程 1-2 次。

11. 差速贴壁之后，大部分肝枯否细胞存在于步骤 8 中接种的皿内，其余皿内只有部分或者少量的肝枯否细胞，可根据具体的细胞纯度和细胞量进行取舍。

12. 培养 48 h 后收集目标细胞，用 0.25% 胰酶差速消化，消化约 1 min，吸弃最先消化下来的细胞，此步骤消化下可能含有贴壁较为不牢固的肝窦内皮细胞。用大鼠肝枯否细胞专用清洗液轻轻吹洗皿底后弃去清洗液，加入新鲜培养基，此后每 2-3 天换液。

13. 细胞消化：肝枯否细胞一般不建议进行消化传代操作，若需要将原皿内的细胞转移，请按照以下操作进行。

(1) 吸弃原上清液，加入 2-3 mL PBS 润洗细胞，弃去 PBS，加入 1 mL 0.25% 胰蛋白酶消化液，轻轻晃动至浸润瓶中所有细胞，37°C 培养箱内消化 2-5 min。

(2) 待大部分细胞收缩变圆后，加入 3-5 mL 完全培养基终止消化。轻轻吹匀、分散细胞，根据实验要求，按比例对细胞进行铺板，开展实验，置于 37°C、5% CO₂、饱和湿度的细胞培养箱中静置培养。



六、常见问题

表2.大鼠肝枯否细胞分离常见问题、原因及解决方法

常见问题	可能原因	解决方法
在流程（三）步骤4后见消化不充分，大量组织块沉积在管底。	组织取材量过多、消化时立起离心管。	组织剪成细小块状、离心管靠壁平放；取用适量的组织，组织沉淀量体积不超过消化液的三分之一。
在流程（三）步骤6复温消化后不能完全吹散组织，仍有块状组织。	组织处理、消化不充分。	确认消化酶保存条件，组织处理时是否完全剪碎，在不破坏大部分细胞活性的情况下可以考虑研磨处理组织。
在流程（四）步骤6中未见分离体系离心后呈明显5层。	不同分离液产生混合。	按照步骤流程（四）步骤5中的描述操作，离心时使用最慢升/降速。
在流程（四）步骤6中未见分离体系经离心后在目标层有细胞白膜层。	消化过度导致细胞死亡。	控制低温消化时间不超过16 h。
得到的细胞量少。	组织取材量少、差速贴壁时间过久。	严格按照说明书要求的鼠龄和大鼠数量（获取肝组织太少可增加提取大鼠数量）；检查细胞是否滞留于前两步差速贴壁的血内，根据结果调整差速贴壁时间。
细胞纯度低、混有杂细胞。	细胞液中混有肝窦内皮细胞。	使用差速消化法去除肝窦内皮细胞（枯否细胞贴壁性强，难以消化，可用胰酶消化1-2 min，将消化得到的肝窦内皮细胞转移）。

七、实验参考图片

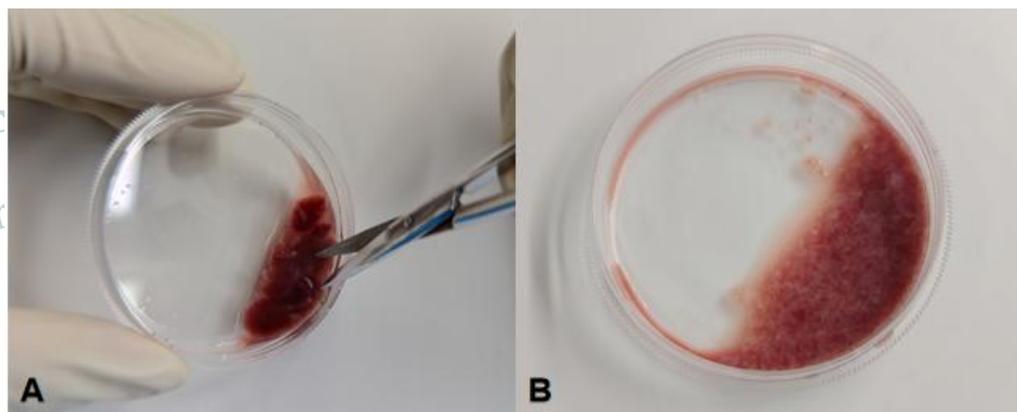


图 1.肝脏组织离体后处理
A:肝组织剪碎操作示范；B: 肝脏剪碎后状态参考



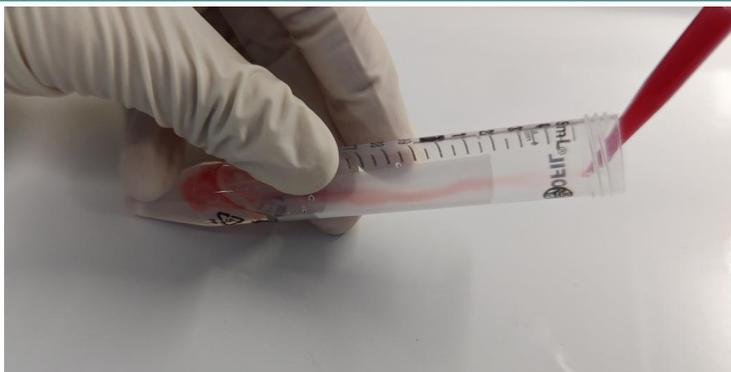


图 2. 细胞悬液与分离液分层操作示范

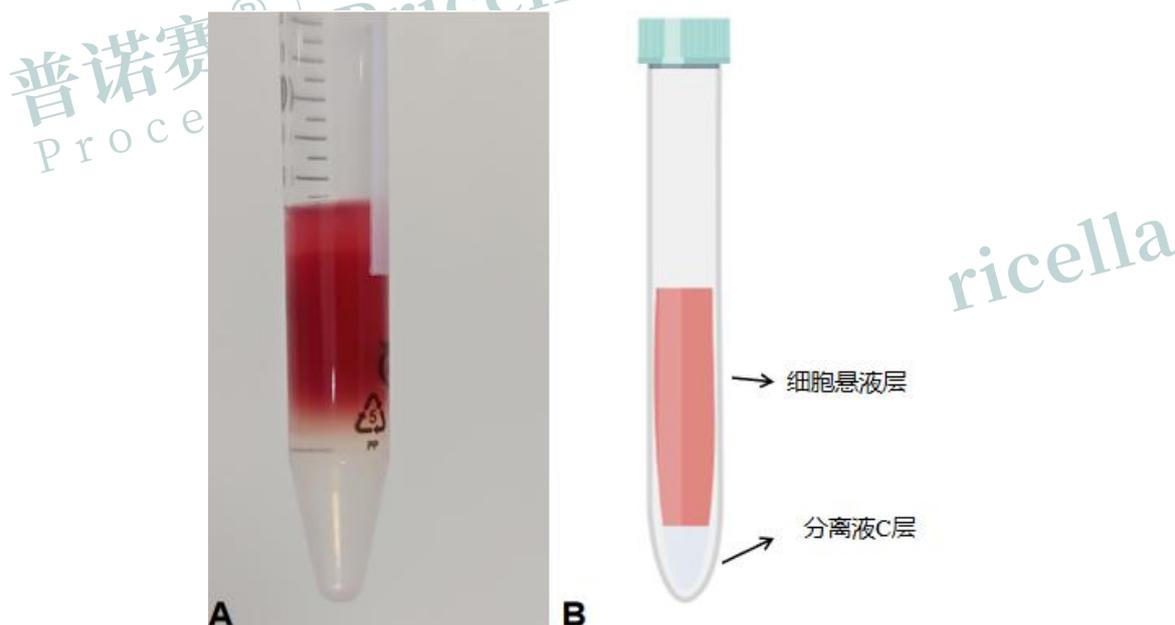


图 3. 液面分层参考图

A: 细胞悬液与分离液C分层后实拍图; B: 细胞悬液与分离液C分层后示意图

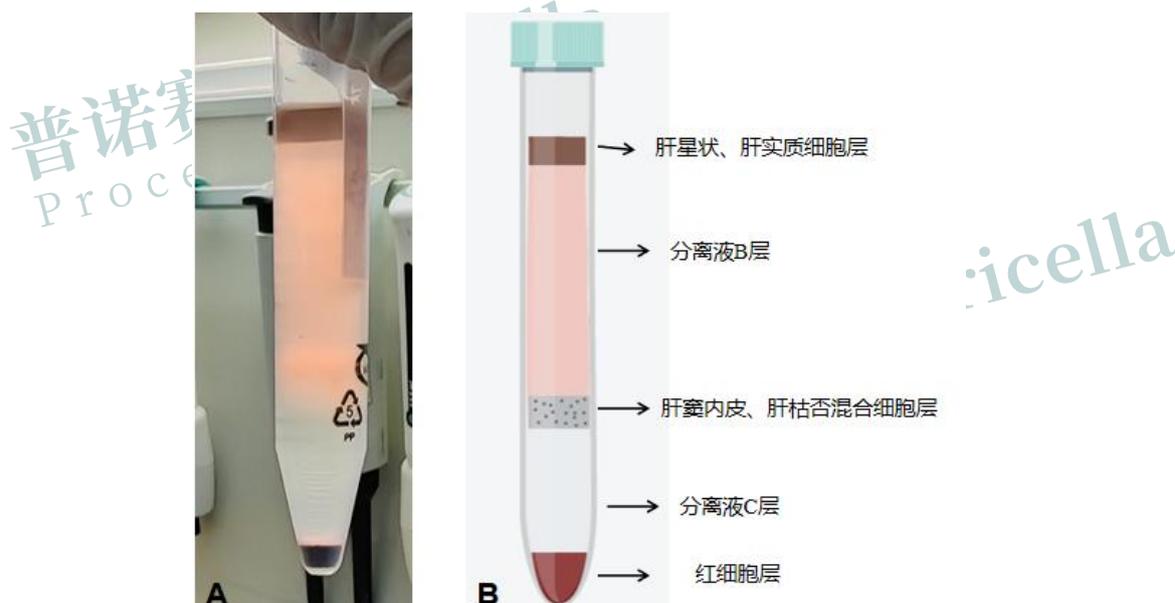


图4. 细胞悬液经分离液离心后参考图

A: 细胞悬液经分离液离心后分层实拍图; B: 细胞悬液经分离液离心后分层示意图

(仅作参考, 细胞层厚度、分离液 B 层颜色深浅会根据实验条件不同)

