

小鼠肝实质细胞分离培养试剂盒

产品货号：P-CA-707

产品规格：3Tests/10Tests

一、产品描述

本试剂盒基于改进的经典原位灌流消化法分离提取小鼠肝实质细胞，每次实验（每 Tests）灌注消化 1 只小鼠的肝组织后，经分离纯化后可获得 1×10^7 以上数量的肝实质细胞，经免疫荧光鉴定，细胞纯度（CK-18 阳性率）>90%。

二、适用范围

本产品适用于 28-84 日龄的昆明、C57BL/6、BALB/c 等不同品系的小鼠。先后经过灌流消化组织、密度梯度离心操作后，经台盼蓝染色和计数，测试可获得 1×10^7 以上的肝实质活细胞，细胞活率达 90% 以上。获得的肝实质细胞继续培养 24 h 后开始分化，之后逐渐丧失肝细胞形态特征，整个培养周期可持续 1-2 周。

三、试剂盒组成成分

试剂盒组成成分见表 1：

表 1：小鼠肝实质细胞分离培养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 |
|---|-------------------------------------|--------|--------------------|
| 小鼠肝实质细胞前灌注液 Pre-perfusion Solution For Mouse Hepatic Parenchymal Cells | 3Tests (125 mL) 10Tests (400 mL) | 无色澄清液体 | 2-8°C, 有效期一年 |
| 小鼠肝实质细胞灌注消化酶稀释液 Diluent Of Perfusion Digestive Enzymes For Mouse Hepatic Parenchymal Cells | 3Tests (125 mL) 10Tests (400 mL) | 红色澄清液体 | 2-8°C, 有效期一年 |
| 小鼠肝实质细胞灌注消化酶 Perfusion Digestive Enzyme For Mouse Hepatic Parenchymal Cells | 3Tests (600 μL) 10Tests (2 mL) | 棕色澄清液体 | -5~-20°C, 有效期一年 |
| 小鼠肝实质细胞专用清洗液 Specialized Washing Solution For Mouse Hepatic Parenchymal Cells | 3Tests (250 mL) 10Tests (500 mL) | 红色澄清液体 | 2-8°C, 有效期一年 |
| 小鼠肝实质细胞专用分离液 Specialized Isolation Solution For Mouse Hepatic Parenchymal Cells | 3Tests (75 mL) 10Tests (250 mL) | 无色澄清液体 | 2-8°C, 有效期一年 |
| 小鼠肝实质细胞专用包被液 Coating Buffer For Hepatic Parenchymal Cells | 3Tests (20 mL) 10Tests (50 mL) | 无色澄清液体 | 2-8°C, 有效期一年 |
| 小鼠肝实质细胞基础培养基 A Basic Culture Medium A For Mouse Hepatic Parenchymal Cells | 3Tests (75 mL) 10Tests (250 mL) | 红色澄清液体 | 2-8°C, 有效期一年 |
| 小鼠肝实质细胞添加剂 A Supplement A For Mouse Hepatic Parenchymal Cells | 3Tests (7.5 mL) 10Tests (25 mL) | 黄色澄清液体 | -5~-20°C, 有效期一年 |



续表 1: 小鼠肝实质细胞分离培养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 |
|---|-------------------------------------|--------|--------------------|
| 小鼠肝实质细胞基础培养基B Basic Culture Medium B For Mouse Hepatic Parenchymal Cells | 3Tests (150 mL) 10Tests (500 mL) | 红色澄清液体 | 2-8°C, 有效期一年 |
| 小鼠肝实质细胞添加剂B Supplement B For Mouse Hepatic Parenchymal Cells | 3Tests (15 mL) 10Tests (50 mL) | 红色澄清液体 | -5~-20°C, 有效期一年 |
| 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 |

注: 各成分请根据试剂管标签上的温度进行保存。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推荐的单次实验用量进行分装, 冻存于-20°C冰箱内, 使用时再次解冻, 避免反复冻融。

四、注意事项

1. 本实验需自备 PBS 缓冲液、台盼蓝染液、注射器、剪刀、镊子、培养器皿、静脉留置针等试剂与耗材, 如需扩大培养需自备完培。
2. 原代肝实质细胞分离过程中若操作不慎, 十分容易产生污染, 请确保实验所用的器具无菌。
3. 原代肝实质细胞不可传代, 请勿使用各种消化酶对提取后长满的肝实质细胞进行消化传代操作。
4. 肝实质细胞对流体剪切力比较敏感, 分离过程中请勿使用涡旋、过度吹打等方式重悬细胞沉淀, 以免影响细胞活性。
5. 可使用蠕动泵、灌注机、手动操作等方式进行肝脏组织灌注, 过程中需注意控制灌注流速, 避免组织消化不完全或者消化过度, 下述步骤中以蠕动泵和手动灌注为例, 灌注方式可根据实验室具体条件进行调整。
6. 小鼠肝脏灌注消化操作复杂, 建议使用本试剂盒之前, 先进行灌注预操作练习, 熟练掌握肝脏灌注技巧后再使用本试剂盒, 以免造成不必要的浪费。
7. 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。
8. 因小鼠灌注过程较为血腥, 本说明书不提供实拍图作为参考, 仅以示意图说明, 如有需要, 请联系普诺赛技术支持获得实验过程实拍图, 联系方式请点击官网: <https://www.procell.com.cn/> 选择【关于我们】→【联系我们】, 可查看技术支持联系热线。

五、操作流程

(一) 实验前准备

1. 培养基配制: 根据实验用量配制肝实质细胞促贴壁培养基、肝实质细胞生长维持培养基。

① 小鼠肝实质细胞促贴壁培养基

小鼠肝实质细胞基础培养基 A: 小鼠肝实质细胞添加剂 A=10:1



② 小鼠肝实质细胞生长维持培养基

小鼠肝实质细胞基础培养基 B: 小鼠肝实质细胞添加剂 B=10:1

2. 实验室自备解剖板、冰盘/冰盒、眼科剪×2、手术直镊×3、手术弯镊×2、显微镊×2、止血夹、6 cm 培养皿、15 mL/ 50 mL 离心管若干。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、弯镊 1、弯镊 2、弯镊 3 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。
3. 小鼠肝实质细胞灌注消化工作液配制
4°C解冻小鼠肝实质细胞灌注消化酶，超净工作台内打开小鼠肝实质细胞灌注消化酶稀释液，将解冻后的小鼠肝实质细胞灌注消化酶转移至其中，稀释比例为 100 μL/20 mL，混匀。
4. 实验开始前，37°C 水浴预热小鼠肝实质细胞前灌注液、小鼠肝实质细胞灌注消化工作液，预热时间为半小时左右。
5. 使用包被液包被培养器皿，37°C 包被 2 h 以上，或者 4°C 包被过夜。

(二) 小鼠灌注消化

1. 小鼠麻醉与固定：使用麻醉剂麻醉小鼠后，用 75%酒精喷洒小鼠全身，转移至超净台中，在解剖板上使用针头固定小鼠。
2. 小鼠解剖：首先沿腹中线剪开小鼠皮肤。用手术直镊 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，使用手术直镊 1 将皮肤拉向两侧，拨开至腹部下方。再用眼科剪 2 剪开小鼠腹部隔膜，手术直镊 2 拨开隔膜至腹部下方。
注：可选操作——剪开腹膜后沿肝脏上方剪开胸腔隔膜，找到肝脏上方的下腔静脉，用止血夹夹住此处静脉（如图1所注位置，此步骤能使后续的灌流消化液充分流经肝脏组织，并且从肝门静脉流出，提高消化效果，若无法准确找出肝上方的下腔静脉和快速完成后续步骤，请忽略此步）。
3. 小鼠灌注：小鼠灌注方法依据实验室具体条件而定，若使用蠕动泵灌流请按照步骤①-③进行，若使用手动灌流，请按照步骤④-⑦进行。

(1) 蠕动泵灌流

①用弯镊 1 向上掀起小鼠肝脏外叶，并向右拨开肠组织，暴露小鼠下腔静脉和肝门静脉（可在小鼠肝脏下方垫一支枪头，使得下腔静脉充分暴露），取灌流针（需排尽空气），进液端连接装有**小鼠肝实质细胞前灌注液**的离心管或装液瓶，针头与下腔静脉平行，针头斜口平面向上，从下腔静脉插入（进针处如图 1 所注位置），针尖插入至血管分叉处上方为止，固定灌流针，使用其他辅助物品（如注射器针头）保持针头不动，避免针尖刺破血管；轻轻拔出针芯，此时可以看见血管内的血液随针芯导出流出，此时外套软管留在血管内，进行灌注。

②打开蠕动泵，使小鼠肝实质细胞前灌注液缓慢灌入，可见肝脏充盈，此时用眼科剪 2 剪开肝门静脉



引流（示意图 2 标注处），保持灌流速度在 5 mL/min，直至排尽肝脏内血液、肝组织呈现蜡黄色为止，灌注量约为 20 mL 左右（灌注过程应如图 3 所示）。

注：此步骤中所有肝叶都应变为蜡黄色，发现有淤血处用弯镊 1 轻轻拨散即可，若出现只有部分肝叶变蜡黄或者出现大面积血色且无法拨散，说明灌流失败，具体原因详见下表 2。

- ③将软管进液端转入 37°C 预热好的装有小鼠肝实质细胞灌注消化工作液的离心管或装液瓶内，避免管内进入空气，开启蠕动泵，继续灌注消化，保持流速在 5 mL/min，灌注过程中用弯镊 1 节律性挤压肝门静脉切口（挤压 3-5 s 左右，间隔 30 s-1 min，让肝脏充盈，提高消化率），灌注时间约为 5-8 min 不等，待看见肝脏组织呈蜂窝点状，轻轻按压肝脏后回弹缓慢，肝脏表面出现龟裂状条纹，说明消化完成。

(2) 手动灌流

- ④使用 50 mL 注射器吸取预热完成的小鼠肝实质细胞前灌注液、小鼠肝实质细胞灌注消化工作液，取下针头，将静脉留置针针座与装有小鼠肝实质细胞前灌注液的注射器锥头相接，并确保稳固，不漏液，排尽注射器和针管内部空气，备用。

- ⑤用弯镊 1 向上掀起小鼠肝脏外叶，并向右拨开肠组织，暴露小鼠下腔静脉和肝门静脉（可在小鼠肝脏下方垫一支枪头，使得下腔静脉充分暴露），用连接注射器的灌流针，针头与下腔静脉平行，针头斜口平面向上，从下腔静脉插针，针尖插入至血管分叉处上方为止，固定灌流针，使用其他辅助物品（如注射器针头）保持针头不动，避免针尖刺破血管；轻轻拔出针芯，此时可以看见血管内的血液随着针芯的导出而流出，此时外套软管留在血管内，进行灌注。

- ⑥轻轻推动注射器，使小鼠肝实质细胞前灌注液进入小鼠肝组织，使用计时器开启计时，控制灌流液打入速度，保持流速在 5 mL/min 左右，见肝脏充盈时，用眼科剪 2 剪开肝门静脉引流（示意图 2 标注处），至排尽肝脏内血液、肝组织呈现蜡黄色为止，灌注时间约为 4-5 min（灌注过程应如图 3 所示）。

注：此步骤中所有肝叶都应变为蜡黄色，发现有淤血处用弯镊 1 轻轻拨散即可，若出现只有部分肝叶变蜡黄或者出现大面积血色且无法拨散，说明灌流失败，具体原因详见下表 2。

- ⑦握住留置针针座，取下注射器，换用装有小鼠肝实质细胞灌注消化工作液的注射器与留置针相连，继续灌注，开启计时器计时，控制流速在 3-5 mL/min，灌注过程中用弯镊 1 节律性挤压肝门静脉切口（挤压 3-5 s 左右，间隔 30 s-1 min，让肝脏充盈，提高消化率），每只鼠使用 30-40 mL 的灌注消化液，待看见肝脏组织呈蜂窝点状，轻轻按压肝脏后回弹缓慢，表面出现龟裂状条纹，说明消化完成。

4. 沿着膈肌周围剪下与肝脏相连的血管和结缔组织，用弯镊 2 轻轻提起肝组织，剪下剩余的连接组织，转移完整的肝脏组织至预先准备好的装有小鼠肝实质细胞专用清洗液的培养皿中。在超净台中用弯镊 2 夹住肝叶连接处以固定住肝组织，弯镊 3 去除胆囊后撕开肝脏外的包膜，轻轻抖动组织可见肝实质细胞似



流沙状流出，未完全分散的部分可用镊子轻轻拨散至细胞清洗液中（如图 4 所示）。

（三）肝实质细胞分离纯化

1. 将 **70 μm 细胞滤网**套在全新的 50 mL 离心管管口，吸取 1-2 mL **小鼠肝实质细胞专用清洗液**润洗 **70 μm 细胞滤网**，用 5 mL 移液枪吸取上述步骤中培养皿内收集的细胞液转移至细胞筛上方过滤，全部过滤完成后，使用 5 mL **小鼠肝实质细胞专用清洗液**润洗皿底，吸取润洗液、过滤。
2. 经离心机 50 g 离心 5 分钟。
3. 弃上清，加入 20 mL **小鼠肝实质细胞专用清洗液**轻轻将细胞沉淀打散，轻轻晃动离心管，使细胞重悬在细胞清洗液中。
4. 重复步骤 2
5. 弃上清，加入 10mL **小鼠肝实质细胞专用清洗液**轻轻将细胞沉淀打散，轻轻晃动离心管，使细胞重悬在细胞清洗液中。
6. 轻轻摇晃后立马吸出微量细胞悬液，使用台盼蓝染色后在显微镜下观察细胞活性（不建议使用普通计数仪计数，与实际结果偏差较大），若细胞活率在 40%以上，可进行后续纯化实验，若活性较低，可能由于消化灌注过度导致，不建议继续实验，具体原因可参考下表 2。
7. 将**小鼠肝实质细胞专用分离液**等量加入至 4 支 15 mL 离心管中，每管 5 mL，沿管壁轻轻加入细胞悬液至细胞分离液上方，使得细胞悬液和分离液产生液面分层。
8. 经 400 g 离心 10 分钟(使用水平转子，加速度减速度均为最低)。
9. 取出离心管，可见离心管从上到下依次为清洗液、死细胞漂浮物、分离液、肝实质细胞沉淀（如图 5 所示），吸弃上清，保留最下层沉淀，沉淀即为活的肝实质细胞。

（四）肝实质细胞培养

1. 将纯化后的肝实质细胞进行台盼蓝染色，染色后在显微镜下直接观察细胞活率，后用细胞计数仪计数。
2. 根据细胞计数所得的细胞数量和活率，按活细胞数 1.5×10^5 cells/cm² 接种。
3. 吸取**小鼠肝实质细胞促贴壁培养基**至包被完成的培养器皿中，按照计算的接种数量吸取相应体积的肝实质细胞悬液，均匀滴加到培养基中，轻轻摇晃后吹打细胞悬液使得细胞均匀分布（若接种密度不匀，极易导致肝实质细胞在器皿中间聚集，导致细胞出现粘黏、漂浮等现象）。
4. 在细胞生长至 4-6 h 之后，显微镜下观察细胞生长形态，可见细胞呈明显的大而圆形、双核状，更换培养基为**小鼠肝实质细胞生长维持培养基**。
5. 细胞培养 24 h 后开始分化，之后会逐渐丧失肝细胞特征，形态越来越不规则。
6. 2-3 天换液一次，可持续培养 1-2 周时间。



六、常见问题

表 2: 小鼠肝实质细胞分离常见问题、原因及解决方法

| 常见问题 | 可能原因 | 解决方法 |
|--|--------------------------------|---|
| 灌注过程中肾脏、右侧髂部和腹部处膨胀。 | 灌注针头扎破血管，导致灌注液流向其余地方。 | 进针时轻微挑起静脉血管，确保针头不向下；固定过程中保持针头部分不动。 |
| 灌注过程中腹腔处蓄积液体，肝脏从膨胀到逐渐皱缩。 | 压力太大导致血管、组织破裂。 | 检查肝门静脉是否完全剪开，灌注过程中勿夹闭肝门静脉过久。 |
| 灌注过程中针头脱落、血管附近蓄积液体。 | 针头进入血管段处太短。 | 以进入下腔静脉血管分叉处上方为宜。 |
| 灌注过程中肝脏未见膨胀，灌注清洗后肝组织仍残留有大片血色部分。 | 针头刺破血管、灌注流速过低。 | 用镊子夹闭肝门静脉，轻轻打入灌注液，观察肝脏是否为整体膨胀，若只有部分膨胀或者不膨胀，说明针头没有完全扎入血管内。建议重新实验。 |
| 灌注后，难以撕开肝包膜，撕开后未见流沙状细胞，轻轻抖动后组织仍保持正常形态。 | 消化酶失活，预热时间过久、消化灌注时流速过高导致消化不充分。 | 检查消化酶保存条件，解冻后在短时间内完成实验；预热时间控制在半小时左右；手动灌注时用计时器控制灌注速度在 5 mL/min 左右。 |
| 灌注成功后细胞活率低、分离液分离后未见管底出现沉淀。 | 消化不充分/过度导致。 | 按照推荐浓度加入消化酶，控制流速。 |
| 染色观察时见细胞结团成块。 | 消化不充分。 | 灌注前预热灌注液，确保打入足量灌注液。 |
| 分离液分离之后，所有细胞沉于底部且有部分细胞沉淀在分离液中悬浮。 | 细胞上样量过多。 | 调整细胞悬液密度，若活细胞过多，可多加入 5 mL 细胞清洗液重悬沉淀。 |
| 接种后传代细胞漂浮。 | 细胞死亡。 | 肝实质细胞不可用消化酶处理、不可传代，建议分离后立即展开相关实验。 |
| 接种后 24 h 内细胞大量漂浮。 | 接种密度过高导致细胞死亡。 | 接种前染色观察细胞活性并计数，控制接种密度。 |
| 细胞接种后状态差。 | 培养基配制不当、未在规定时间内换液。 | 按照本说明书（一）中步骤 1 相关描述配制培养基，按照本说明书（四）中步骤 4 要求更换培养基。 |
| 细胞接种后在中间聚集，四周细胞相对较少。 | 细胞分布不匀。 | 接种时均匀滴加细胞悬液，不要直接全部打入培养基中，摇晃器皿后使用枪头或者吸管轻柔吹打混匀，放入培养箱前使用显微镜观察确认。 |



七、实验参考图片

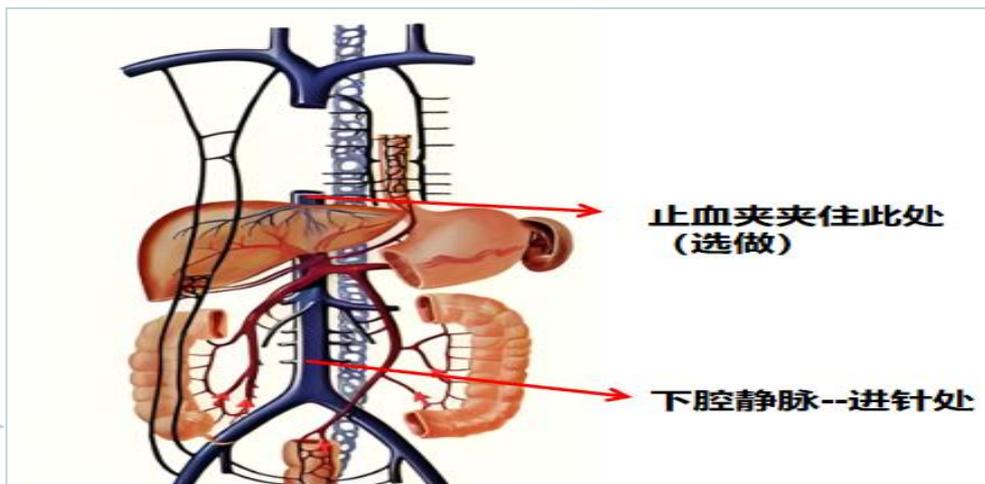


图 1.肝门静脉系及灌注进针处

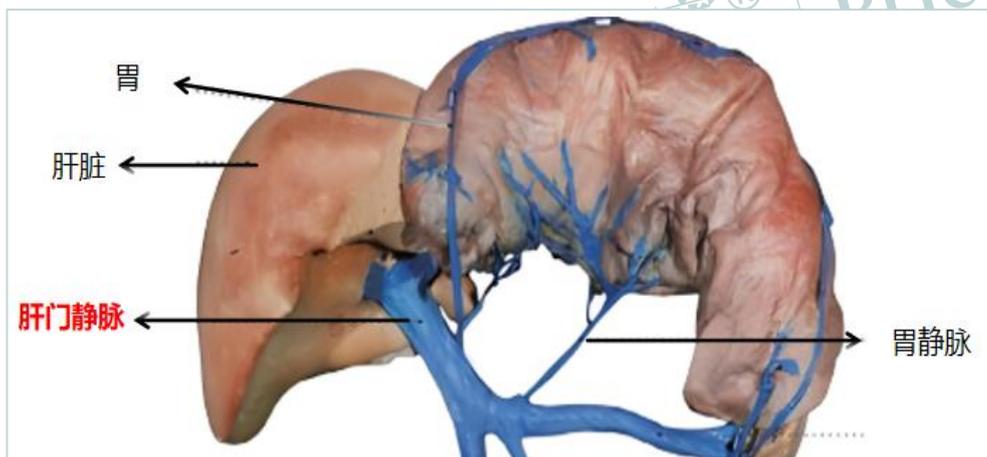


图 2.肝门静脉解剖示意图

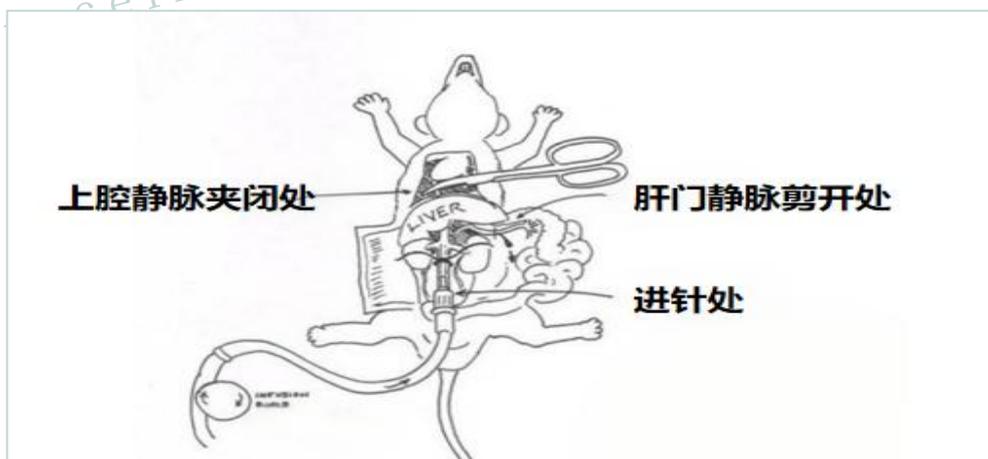


图 3.灌注过程总览示意图



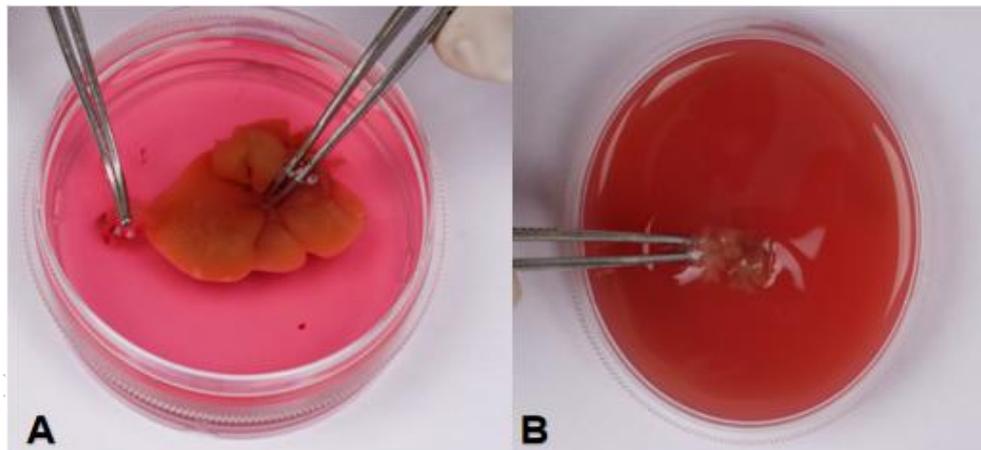


图 4.肝脏离体后处理

A: 撕下肝脏表面肝包膜; B: 轻轻抖动组织, 使细胞流出, 最后只有部分残留组织

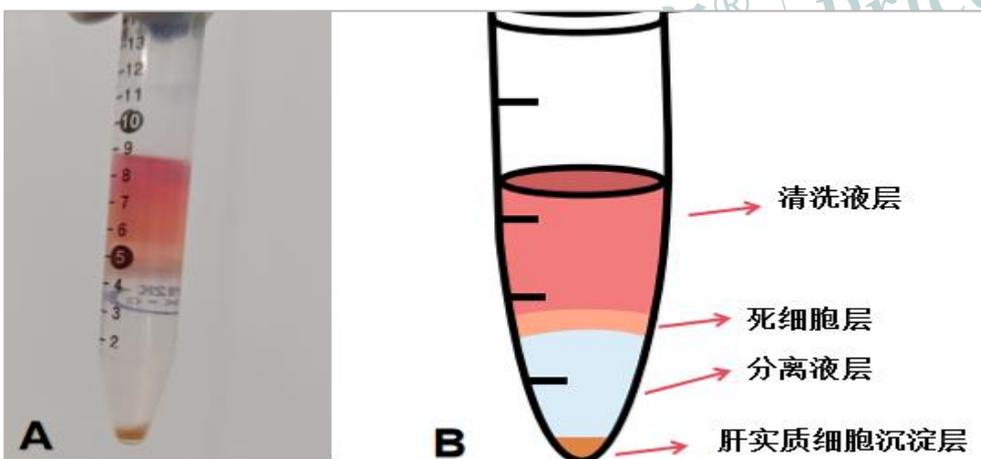


图 5.经分离液处理离心后细胞悬液分层情况

A: 细胞悬液经分离液离心分离后实拍图; B: 细胞悬液经分离液离心分离后示意图

