

大鼠肝实质细胞分离试剂盒

Cat NO: IMP-RK001

产品描述

肝实质细胞是肝功能的基本组成单位，大约占肝脏体积及数量的 80%左右，肝实质细胞具有多方面的功能，例如：蛋白质的合成和储存、分泌胆汁和解毒物质等。体外培养的肝实质细胞是研究肝脏能量代谢、物质合成、药理毒性学良好模型。试剂盒采用二步灌流法，使得原代肝实质细胞从在体肝脏中消化，结合细胞纯化液使用可快速纯化得到大鼠肝实质细胞。使用本试剂盒提取所得的大鼠肝原代实质细胞纯度>90.0%，纯化后可直接进行 RT-qPCR、Western blot等基本生物学实验，贴壁后可进行药理、病理、毒理学、免疫染色等实验操作。

适用范围

该试剂盒适用于 Sprague-Dawley、Wistar-Imamichi 等不同型号 5~6 周龄大鼠的原代肝实质细胞提取试剂盒。

运输和存储条件

2-8 °C 保存与运输，保质期为参考下表。所有组分开封后，有效期为 6-8 周，建议尽快使用。

配套培养基信息

表 1. 试剂盒组成信息

产品货号	产品名称	产品规格	储存条件
IMP-RK001B	大鼠肝实质灌注液 I	500 mL	2-8°C 3 个月
IMP-RK001C	大鼠肝实质灌注液 II	250 mL	2-8°C 3 个月
IMP-RK001Q	细胞洗液	500 mL	2-8°C 3 个月
IMP-RK001D	活细胞纯化分离液	50 mL	2-8°C 6 个月
IMP-RK001E	活细胞纯化分离稀释液	100 mL	2-8°C 6 个月

IMP-RK001A	I 型鼠尾胶原蛋白	20 mL	2-8℃ 3 个月
IMP-RK00101	肝实质贴壁培养基	100 mL	2-8℃ 3 个月
IMP-RK00102	肝实质维持培养基	250 mL	2-8℃ 3 个月

分离步骤

实验前准备：将大鼠肝实质灌注液 I、灌注液 II 置于水浴锅中加热至 37℃，备用。实验需自备注射器、静脉留置针/静脉输液针、手术器械、100 μm 过滤筛、离心管若干。

一、实验前准备

1. 肝实质细胞种板前预先用 I 型鼠尾胶原蛋白（以下简称鼠尾胶）铺至培养器皿底部包被 0.5-2h（最长不超过 6 h），吸尽鼠尾胶，鼠尾胶可回收使用 1-2 次。

2. 使用 1 × PBS 清洗皿底后吸去 PBS，待用。

二、肝脏灌注

1. 麻醉并且固定大鼠，酒精喷洒清洗腹部。

2. 剪开大鼠腹腔，沿肝脏上方剪开胸腔隔膜，使上腔静脉暴露，用止血钳夹住上腔静脉。

3. 拨开大鼠肠组织，暴露大鼠下腔静脉和肝门静脉，在下腔静脉的位置插入静脉留置针/静脉输液针并固定好位置（使用留置针则轻轻拔出针芯，拔出时针管处有回血，此时外套软管留在血管内）进行灌注。

4. 将装有肝实质灌注液 I 的注射器与针的另一头相连接，保持灌流速度在 30 mL/min，灌注液 I 灌入后可见肝脏充盈，此时剪开门静脉引流，直至肝脏表面血丝较少或无血色，绝大部分肝组织表面呈现蜡黄色为止。

5. 换上肝细胞灌注液 II，流速改为 10 mL/min 进行灌流，并节律性挤压门静脉切口（挤压 5-10s 左右，间隔 30s-1min，让肝脏充盈，提高消化率），持续消化 15-25min 不等，消化肝脏直至用棉签按压肝脏有明显塌陷感，且回弹速度变慢。

6. 将肝脏沿着膈肌周围整个剪下来，转移到一个装有预冷后的细胞洗液的培养皿中。在超净台中用镊子去除胆囊和肝脏外的包膜，轻轻抖动组织使肝实质细胞如流沙状流出，未完全分散的部分用镊子轻轻拨散至细胞洗液中。

三、肝实质分离纯化

1.用细胞洗液润洗 100 μm 筛网，将上述步骤中的培养皿内的细胞浊液用宽头吸头或者巴氏管移至筛网上方过滤。

2.4℃、50 xg 离心 5 分钟。

3.小心弃去上清（低速离心后，肝实质细胞以松散的方式沉在底部，弃上清时切勿吸力过大或者直接倾倒上清），加入 15 mL 细胞洗液，用宽头吸头或者巴氏管轻轻重悬沉淀。

4.重复步骤2，小心弃去上清，加入细胞洗液重悬细胞沉淀。

5.依据细胞活率和数量配置 30%-50%的活细胞纯化液（**纯化液浓度越高，得到的肝实质细胞活性越好，但与此同时，得到的细胞数量会减少**，需要依据实验进行取舍，如配置30% 细胞纯化液配方为：细胞纯化液：分离纯化稀释液 = 3:7）。将细胞悬液小心添加至**两倍体积**的细胞纯化液面上，细胞悬液与细胞纯化液间应产生明显分层。

6.400 x g、4 °C离心 10 分钟（**使用水平转子，加速度减速度均为最低**）。

7.离心完毕后离心管底部的沉淀即为纯化后的肝实质细胞，用贴壁培养基重悬。

四、肝实质细胞培养

1.将细胞悬液按照 $3 \times 10^5/\text{mL}$ 细胞密度铺至鼠尾胶包被的培养器皿中，转移至细胞培养箱中。

2.4 h 后显微镜下观察，肝实质细胞呈较大圆形、有明显双核结构，将培养器皿内的贴壁培养基更换为维持培养基。

注意事项

1.肝脏离体后建议在冰上操作，分散肝实质细胞时应避免使用尖头吸头、过度重悬等操作导致细胞机械损伤。

2.大鼠肝脏较大，如分散出来细胞较多，但还有较多肝组织未分散，可以将该部分肝组织转移至 1-2 个新的装有预冷细胞洗液的培养皿中进行进一步分散。

3.大鼠肝脏肝包膜要尽可能完全去除，否则有杂细胞干扰，影响细胞纯度。

4.由于大鼠肝脏能够分离出较多肝实质细胞，进行细胞纯化步骤时可以多配置几管活细胞纯化液进行使用，避免纯化效果差。

5.肝实质细胞在贴壁2-3 天后分化明显，建议在3 天内完成实验。

6.肝实质细胞为不可传代细胞，禁止使用胰酶等消化酶处理肝实质细胞。

7.小鼠肝实质灌注液 II 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，按照需要量分装，并且用封口膜封住瓶口，即取即用，以避免污染