

大鼠肝星状细胞分离试剂盒

Cat NO: IMP-RK003

产品描述

肝星状细胞（Hepatic Stellate Cells, HSCs）是肝脏合成细胞外基质的主要细胞群，肝星状细胞具有多方面的功能，例如：分泌蛋白多糖、糖蛋白等细胞外基质成分，合成一定量的胶原以维持正常的基底膜结构，以及通过其突起的收缩参与肝窦的微循环调节。肝损伤导致的 HSCs 的激活、增殖及转化是肝纤维化过程中的重要环节，因此肝星状细胞在探讨新的抗肝纤维化治疗措施，对降低慢性肝病的发生率和死亡率具有不可估量的理论意义。试剂盒采用二步灌注法+水浴消化法，结合细胞纯化液使用可快速纯化得到大鼠肝星状细胞。使用本试剂盒提取所得的大鼠原代肝星状细胞纯度>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 周龄大鼠的原代肝星状细胞提取试剂盒。

规格

本试剂盒规格为 2 次（以 1 只 5~6 周龄大鼠为 1 次计，约得到 2×10^6 - 4×10^6 个细胞）

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

产品名称	产品规格	储存条件
大鼠肝星状细胞灌注液 I	500 mL	2-8°C 3 个月

大鼠肝星状细胞灌注液 II	250 mL	2-8°C 3 个月
大鼠肝星状细胞消化液	50 mL	2-8°C 3 个月
大鼠肝星状细胞消化终止液	200 mL	2-8°C 3 个月
细胞洗液	500 mL	2-8°C 3 个月
活细胞纯化分离液	20 mL	2-8°C 6 个月
活细胞纯化分离稀释液	50 mL	2-8°C 6 个月
I 型鼠尾胶原蛋白	20 mL	2-8°C 3 个月
肝星状细胞贴壁专用培养基	100 mL	2-8°C 3 个月
肝星状细胞专用完全培养基	250 mL	2-8°C 3 个月

分离步骤

实验前准备：将大鼠肝星状细胞灌注液 I、灌注液 II、消化液置于水浴锅中加热至37°C，备用。

实验需自备蠕动泵（若无蠕动泵，选择方案二，但效果不如方案一好）、注射器、静脉留置针、手术器械、75 μm 过滤筛、培养皿、离心管若干。

一、培养皿包被

1. 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 PBS 清洗皿底后吸去 PBS，备用。

二、肝脏消化

方案一：

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，让肝脏充盈，提高消化率），消化肝脏直至用棉签按压肝脏有塌陷感或者部分透明感，条纹样的裂纹。

6. 将肝脏沿着膈肌周围整个剪下来置于装有细胞洗液的培养皿中，转移到超净台中清洗一遍。将清洗后的肝脏组织转移至新的装有大鼠肝星状细胞消化液的培养皿，用镊子小心去除肝脏外的包膜，轻轻撕裂肝组织使肝脏混合细胞散落至培养皿中，未完全分散的部分及肝窦位置用镊子轻轻划至肝星状细胞消化液中。（注：大鼠肝实质细胞数量较多，可以先将肝脏转移至细胞洗液中对大部分肝实质细胞进行分散，方便后续肝星状细胞纯化。）

7. 将培养皿中的肝混合细胞收集于 **50mL** 离心管中，**37°C**水浴消化 20 分钟。

8. 用 3-4 倍体积的细胞消化终止液终止消化。

方案二：

1. 麻醉并且固定大鼠，酒精喷洒清洗腹部。

2. 将装有肝星状细胞灌注液 I 的注射器的射端（不需要用到针头）与静脉留置针相连接。

3. 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。

4. 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并固定好位置，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，手推压注射器进行灌注，保持灌流速度为 **30 mL/min**

5. 当见到肝脏充盈，立即剪开门静脉引流，保持至排尽肝脏内血液、肝组织呈现蜡黄色为止。

6. 换上肝细胞灌注液 II，将灌流速度改为 **10 mL/min**。并用棉签节律性按压门静脉切口（挤压5-10s左右，让肝脏充盈，提高消化率），消化肝脏直至用棉签按压肝脏有塌陷感或者部分透明感，条纹样的裂纹。

7. 将肝脏沿着膈肌周围整个剪下来置于装有细胞洗液的培养皿中，转移到超净台中清洗一遍。将清洗后的肝脏组织转移至新的装有大鼠肝星状细胞消化液的培养皿，用镊子小心去除肝脏外的包膜，轻轻撕裂肝组织使肝脏混合细胞散落至培养皿中，未完全分散的部分及肝窦位置用镊子轻轻划至肝星

状细胞消化液中。（注：大鼠肝实质细胞数量较多，可以先将肝脏转移至细胞洗液中对大部分肝实质细胞进行分散，方便后续肝星状细胞纯化。）

8. 将培养皿中的肝混合细胞收集于 50mL 离心管中，37℃水浴消化 20 分钟。

9. 用 3-4 倍体积的细胞消化终止液终止消化。

三、肝星状分离纯化

1. 用细胞洗液润洗 70 μ m 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℃，600 xg 离心 10 分钟。

3. 弃去上清，用细胞洗液进行重悬，离心：4℃，50 xg，5 分钟。

4. 吸取大部分上清至新的离心管中（细胞沉淀为肝实质细胞），将细胞悬液进行离心：4℃，50 xg，5 分钟。

5. 吸取大部分上清至新的离心管中（细胞沉淀为肝实质细胞），将细胞悬液进行离心：4℃，600 xg，10 分钟。

6. 弃去上清，用 4mL 细胞洗液重悬细胞。

7. 配置25%、50%的活细胞纯化液各4 ml（如配置25% 细胞纯化液配方为：细胞纯化液：分离纯化稀释液 = 1:3）。先将 4 ml 25%活细胞纯化液加入 15ml 离心管中，再将 4 ml 50%的活细胞纯化液加入到 25%活细胞纯化液下面，再将 4 ml 细胞悬液小心添加至活细胞纯化液面上，细胞悬液与细胞纯化液间应产生明显分层。

8. 4℃，1500 x g 离心25 分钟（使用水平转子，加速度减速度均为最低）。

9. 离心完毕后肝星状细胞处于 25%-50%的活细胞纯化液之间。

10. 收集肝星状细胞至 15ml 离心管中，用细胞洗液填满 15ml 离心管。1500 xg，5 分钟。

11. 用 3ml 细胞洗液重悬细胞沉淀。1500 xg，5 分钟。

12. 肝星状细胞贴壁专用培养基重悬细胞沉淀，种板（此时用的为未包被的培养器皿，目的是进一步纯化肝星状细胞），放细胞培养箱中贴壁 5 分钟，期间可 3-4 次取出该培养器皿进行轻轻摇晃，避免肝星状细胞贴壁。

13. 5 分钟后收集培养基（未贴壁的肝星状细胞），根据实验要求调整细胞密度重新种板。此时使用包被好的培养皿。

14. 24H 后用PBS 冲洗 1-2 次以去除残留在皿中的细胞碎片，换成肝星状细胞专用完全培养基以维持肝星状细胞生长。

注意事项

1. 肝脏灌注液在灌注肝脏过程中需保证温度稳定在37℃。
2. 大鼠肝脏包膜应尽量去除，避免影响肝星状细胞纯度。
3. 大鼠的肝实质细胞数量较多，建议对肝星状细胞二次消化前先将肝实质细胞大部分游离至细胞洗液收集或弃去，以便后续获得纯度较高的肝星状细胞。
4. 肝脏水浴消化的时间可以根据肝脏灌注情况适当调整，但不建议超过 30 分钟。
5. 添加不同配比活细胞纯化液时应该小心操作，**保证不同配比活细胞纯化液间的界线清晰**，否则较难获得细胞。
6. 大鼠肝星状细胞若铺板密度合适，可稳定传 3-5 代，建议使用肝星状细胞专用消化液进行消化，
7. 传代后的肝星状细胞有大部分为自发活化的肝星状细胞，若需使用静息状态下的肝星状细胞进行实验，建议在稳定贴壁后（24h 后）尽快完成实验。
8. 因分离肝星状细胞的离心转速较高，分离完毕后会有较多杂质和碎片，其属于正常现象。
9. 大鼠肝星状灌注液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。