

# 小鼠 Kupffer 细胞分离试剂盒

Cat NO: IMP-MK005

## 产品描述

Kupffer 细胞 (Kupffer cells, KCs)，亦称为肝巨噬细胞，是位于肝脏中的特殊巨噬细胞，同时也是单核吞噬细胞系统的一部分。KCs 通过模式识别受体识别外源和内源的危险信号，激活后分化为 M1 型和 M2 型。KCs 在肝脏的基本功能包括：吞噬清除病原;抗原递呈,启动适应性免疫;促进肝细胞再生等。该试剂盒采用二步灌流法+水浴消化法，结合生物素抗体-链霉亲和素磁珠进行阳选，可快速纯化得到小鼠肝脏 Kupffer 细胞。使用本试剂盒提取所得的小鼠原代肝脏 Kupffer 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 C57BL/6J、BALB/c 等不同品系 6 周龄以上小鼠的原代肝脏 Kupffer 细胞提取试剂盒。

## 规格

本试剂盒规格为 10 次（以 1 只 6 周龄以上小鼠为 1 次计，约得到  $5 \times 10^5$ - $7 \times 10^5$  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

产品货号	产品名称	产品规格	储存条件
IMP-MK005A	小鼠肝脏 Kupffer 细胞灌注液 I	500 mL	2-8°C 3 个月
IMP-MK005B	小鼠肝脏 Kupffer 细胞灌注液 II	500 mL	2-8°C 3 个月
IMP-MK005C	小鼠肝脏 Kupffer 细胞消化液	100 mL	2-8°C 3 个月

IMP-MK005D	小鼠肝脏 Kupffer 细胞消化终止液	500 mL	2-8°C 3 个月
IMP-MK005Q	细胞洗液	200 mL	2-8°C 3 个月
IMP-MK005E	分选 Buffer	125 mL	2-8°C 3 个月
IMP-MK005F	分选试剂	25 $\mu$ L	2-8°C 6 个月
IMP-MK005G	肝脏 Kupffer 细胞分选磁珠	110 $\mu$ L	2-8°C 6 个月
IMP-MK00501	肝脏 Kupffer 细胞专用培养基	100 mL	2-8°C 3 个月

## 分离步骤

实验前准备：将小鼠肝脏 Kupffer 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  $\mu$ m 过滤筛、培养皿、离心管若干、磁力架（推荐配套购买我司的**磁吸分离器：IMP-IN001**）。

### 一、肝脏消化

#### 方案一：

1. 麻醉并且固定小鼠，酒精喷洒清洗腹部。
2. 将蠕动泵的软管冲洗完毕后，软管一端置于预热好的肝脏 Kupffer 细胞灌注液 I 内，软管另一端与静脉留置针相连接并设置好**灌流速度为 5 mL/min**。
3. 剪开小鼠腹腔，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. 拨开小鼠肠组织，暴露小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，启动蠕动泵进行灌注。
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. 换上肝脏 Kupffer 细胞灌注液 II，将灌流速度改为3 mL/min。并用棉签**节律性按压门静脉切口**（挤压 5-10s 左右，间隔 30s-1 min，让肝脏略微充盈，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小鼠肝脏 Kupffer 细胞消化液的培养皿，用镊子小心去除胆囊和肝脏外的包膜，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总管**用镊子轻轻拨碎至肝脏 Kupffer 细胞消化液中。

8. 将培养皿中的肝混合细胞及消化液收集于 50mL 离心管中，37°C 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。

## 方案二：

1. 麻醉并且固定小鼠，酒精喷洒清洗腹部。
2. 将装有肝脏 Kupffer 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. 剪开小鼠腹腔，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. 拨开小鼠肠组织，暴露小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 5 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 3 mL/min。并用棉签节律性按压门静脉切口（挤压 5-10s 左右，间隔 30s-1 min, 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小鼠肝脏 Kupffer 细胞消化液的培养皿，用镊子小心去除胆囊和肝脏外的包膜，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总管用镊子轻轻拨碎至肝脏 Kupffer 细胞消化液中。
8. 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。
9. 用 3-4 倍体积的细胞消化终止液终止消化。

## 二、肝脏 Kupffer 细胞分离纯化

1. 用细胞洗液润洗 75  $\mu\text{m}$  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°C，300 xg 离心 10 分钟。
3. 弃去上清，用细胞洗液进行重悬，离心：4°C，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°C，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°C，300 xg，10 分钟。

6. 弃去上清，用 100 $\mu$ L 分选 Buffer 重悬细胞。（经验一只鼠约  $2 \times 10^7$  个非实质细胞，包含碎片）
7. 将 100 $\mu$ L 细胞悬液（以一只鼠的非实质细胞为例）加入离心管底部，再加入 2  $\mu$ L 分选试剂，混匀后于 4 $^{\circ}$ C 孵育 15 min，期间每隔 5 min 轻弹离心管管壁使抗体和细胞混合均匀。
8. 孵育完成后，加入 1 mL 分选 Buffer 重悬，离心：500 g，离心 5 min。
9. 用 100  $\mu$ L 分选 Buffer 重悬细胞，加入 10  $\mu$ L 肝脏 Kupffer 细胞分选磁珠（使用前涡旋振荡重悬磁珠，**确保磁珠完全重悬**），混匀后 4 $^{\circ}$ C 孵育 10 min，期间每隔 5 min 轻弹离心管管壁，使磁珠和细胞混合均匀。
10. 孵育完成后，加入 1 mL 分选 Buffer 重悬，离心：500 g，离心 5 min
11. 用 1 mL 分选 Buffer 重悬细胞，将含有细胞的离心管置于磁力架上，静置 5 min，待磁珠被吸附后，在磁力架上小心弃去液体部分（即非目的细胞），保留磁珠吸附部分（即肝脏 Kupffer 细胞）。
12. 取出离心管，用 1mL 分选 Buffer 重悬磁珠吸附部分的细胞，重复步骤 112-3 次
13. 用肝脏 Kupffer 细胞专用培养基重悬细胞后即可调整细胞密度进行种板。（1 只 8W 小鼠约种 1 个 12 孔）

### 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 $^{\circ}$ C。
2. 肝脏离体后建议在冰上操作，分散肝脏 Kupffer 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。
3. 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。
4. 该分离试剂盒建议与逸漠生物磁力架配套使用，若使用分选柱进行分选的话可能会导致细胞数量少、状态不佳等。
5. 小鼠肝脏 Kupffer 细胞分离试剂盒中的产品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。