小鼠肝星状细胞分离试剂盒

Cat NO: IMP-MK003

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。试剂盒采用二步灌流法+水浴消化法，结合细胞纯化液使用可快速纯化得到小鼠肝星状细胞。使用本试剂盒提取所得的小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 C57BL/6J、BALB/c 等不同品系6 周龄以上小鼠的原代肝星状细胞提取试剂盒。

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 5×10^5-7×10^5 个细胞）

运输和存储条件

2-8 ℃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-MK003B	小鼠肝星状细胞灌注液 I	500 mL	2-8°C 3 个月
IMP-MK003C	小鼠肝星状细胞灌注液 II	500 mL	2-8°C 3 个月
IMP-MK003F	小鼠肝星状细胞消化液	100 mL	2-8°C 3 个月

IMP-MK003G	小鼠肝星状细胞消化终止液	500 mL	2-8°C 3 个月
IMP-MK003Q	细胞洗液	500 mL*2	2-8°C 3 个月
IMP-MK003D	细胞纯化分离液	100 mL	2-8°C 6 个月
IMP-MK003E	细胞纯化分离稀释液	200 mL	2-8°C 6 个月
IMP-MK003A	Ⅰ 型鼠尾胶原蛋白	20 mL	2-8°C 3 个月
IMP-MK00301	肝星状细胞贴壁专用培养基	100 mL	2-8°C 3 个月
IMP-MK00302	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：将小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℃， 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 0.5-2 h（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星状细胞灌注液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．换上肝星状细胞灌注液 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 30 s-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星状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星状细胞消化液中。

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℃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 30 s-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星状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星状细胞消化液中。

8．将培养皿中的肝混合细胞收集于 50mL 离心管中，37℃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 75 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℃， 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，10 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，10 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（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 3ml 25%活细胞纯化液加入 15ml 离心管中，再将 3ml 50%的活细胞纯化液加入到25%活细胞纯化液下面，再将 2ml 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 xg 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2-3 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. 肝脏离体后建议在冰上操作，分散肝星状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. 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。

5. 肝星状细胞为不可增殖不可传代细胞，禁止使用胰酶等消化酶处理肝星状细胞，并在肝星状细胞稳定贴壁后（24h 后）尽快完成实验。

6. 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。

7. 小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。