

小鼠肝窦内皮细胞分离试剂盒

Cat NO: IMP-MK004

产品描述

肝窦内皮细胞（Liver sinusoidal endothelial cells，LSECs）是肝脏中主要的非实质细胞，位于肝窦腔与 Disse 间隙之间，是肝内物质交换的屏障。肝窦内皮细胞因富含窗孔结构、缺乏隔膜、内皮下缺少基底膜而与普通血管内皮细胞不同。肝窦内皮细胞在肝脏的生理、病理及肝脏缺血再灌注过程中具有非常重要的作用。试剂盒采用二步灌注法+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窦内皮细胞。使用本试剂盒提取所得的小鼠原代肝窦内皮细胞纯度>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窦内皮细胞提取试剂盒。

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 8×10^5 - 1×10^6 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-MK004A	小鼠肝窦内皮细胞灌注液 I	500 mL	2-8℃ 3 个月
IMP-MK004B	小鼠肝窦内皮细胞灌注液 II	500 mL	2-8℃ 3 个月
IMP-MK004C	小鼠肝窦内皮细胞消化液	100 mL	2-8℃ 3 个月
IMP-MK004D	小鼠肝窦内皮细胞消化终止液	500 mL	2-8℃ 3 个月

IMP-MK004Q	细胞洗液	200 mL	2-8℃ 3 个月
IMP-MK004E	分选 Buffer	125 mL	2-8℃ 3 个月
IMP-MK004F	肝窦内皮细胞分选试剂	44 μ L	2-8℃ 6 个月
IMP-MK004G	肝窦内皮细胞分选磁珠	210 μ L	2-8℃ 6 个月
IMP-MK00401	肝窦内皮细胞专用培养基	100 mL	2-8℃ 3 个月

分离步骤

实验前准备：将小鼠肝窦内皮细胞灌注液 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 μ 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窦内皮细胞灌注液 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. 换上肝窦内皮细胞灌注液 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窦内皮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窦内皮细胞消化液中。
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. 将装有肝窦内皮细胞灌注液 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窦内皮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窦内皮细胞消化液中。
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。

二、肝窦内皮细胞分离纯化

1. 用细胞洗液润洗 75 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℃，300 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℃，300 xg，10 分钟。

6. 弃去上清，用分选 Buffer 重悬细胞，调整细胞密度大约至 1×10^8 cells/mL。（经验一只鼠约 2×10^7 个非实质细胞）

7. 将 100 μ L 细胞悬液（以 1×10^7 个细胞为例）加入离心管底部，再加入 2 μ L 分选试剂，混匀后于 4℃ 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 μ L 分选 Buffer 重悬细胞，加入 10 μ L 肝窦内皮细胞分选磁珠（使用前涡旋振荡重悬磁珠，**确保磁珠完全重悬**），混匀后 4℃ 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（以分选 1×10^7 个肝非实质细胞中的肝窦内皮细胞为例，如果分选更多的细胞，则可按比例增加分选试剂及肝窦内皮细胞分选磁珠的用量，少于 1×10^7 个细胞则将细胞悬液体积补至 100 μ L，加入 2 μ L 分选试剂和 10 μ L 肝窦内皮细胞分选磁珠）

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（即肝窦内皮细胞）。

12. 取出离心管，用 1 mL 分选 Buffer 重悬细胞，重复步骤 11 2-3 次

13. 用肝窦内皮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℃。

2. 肝脏离体后建议在冰上操作，分散肝窦内皮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. 使用肝窦内皮细胞专用培养基可少量增殖，但增殖速度较慢，增殖后会胞体变大，其属正常现象。

5. 肝窦内皮细胞不建议传代，因传代后会出现细胞形变、破碎等现象。

6. 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。

7. 小鼠肝窦内皮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。