

小鼠肝窦内皮细胞分离培养试剂盒

产品货号：GP-CA-709

产品规格：3Tests/10Tests

一、产品描述

小鼠肝窦内皮细胞分离培养试剂盒专为提取原代小鼠肝窦内皮细胞开发，经验证，按照本试剂盒方法标准操作，1 Test 可获得一瓶细胞（T25 培养瓶），细胞数 $>1 \times 10^6$ cells，按照 1:2 比例传代，可传代一次，经免疫荧光鉴定，细胞纯度（CD31/CD14 阳性率） $>90\%$ 。

二、适用范围

本产品适用于 14-84 日龄的不同品系的小鼠中提取肝窦内皮细胞。组织经分离、消化、铺板纯化 48 h 后可获得肝窦内皮细胞量 $>1 \times 10^6$ cells。

注：1-2 只 14-28 日龄或者 1 只 35-84 日龄的小鼠完整肝组织，可获得一个 T25 培养瓶的细胞，具体的细胞量可能因取材获得的肝窦内皮组织大小和数量不同而有所变化。

三、试剂盒组成成分

本试剂盒组成成分如下表：

表 1：小鼠肝窦内皮分离试剂盒组成成分及相应信息

成分名称	产品规格	性状	储存条件
小鼠肝窦内皮细胞专用清洗液 Specialized Washing Solution For Mouse Liver Sinusoidal Endothelial Cells	3Tests (250 mL) 10Tests(500 mL×2)	淡黄色澄清液体	2-8℃，有效期一年
小鼠肝窦内皮细胞组织消化酶稀释液 Diluent Of Digestive Enzyme For Mouse Liver Sinusoidal Endothelial Cells	3Tests (15 mL) 10Tests (50 mL)	无色澄清液体	2-8℃，有效期一年
小鼠肝窦内皮细胞组织消化酶 Specific Digestive Enzyme For Mouse Liver Sinusoidal Endothelial Cells	3Tests (1.5 mL) 10Tests (5 mL)	淡黄色澄清液体	-5~20℃，有效期一年
小鼠肝窦内皮细胞专用分离液A Special Separation Solution A For Mouse Liver Sinusoidal Endothelial Cells	3Tests (20 mL) 10Tests (75 mL)	无色澄清液体	2-8℃，有效期一年
小鼠肝窦内皮细胞专用分离液B Special Separation Solution B For Mouse Liver Sinusoidal Endothelial Cells	3Tests (20 mL) 10Tests (75 mL)	无色澄清液体	2-8℃，有效期一年
小鼠肝窦内皮细胞专用分离液C Special Separation Solution C For Mouse Liver Sinusoidal Endothelial Cells	3Tests (10 mL) 10Tests (30 mL)	无色澄清液体	2-8℃，有效期一年
小鼠肝窦内皮细胞基础培养基 Basic Culture Medium For Mouse Liver Sinusoidal Endothelial Cells	3Tests (100 mL) 10Tests (300 mL)	红色澄清液体	2-8℃，有效期一年



续表 1：小鼠肝窦内皮分离试剂盒组成成分及相应信息

成分名称	产品规格	性状	储存条件
小鼠肝窦内皮细胞培养基添加剂 Supplement For Mouse Liver Sinusoidal Endothelial Cells	3Tests (10 mL) 10Tests (30 mL)	黄色澄清液体	-5~-20℃，有效期一年
70 μm 细胞滤网 70 μm Cell Filter	3Tests (3个) 10Tests (10个)	橙色	常温，有效期三年
100 μm 细胞滤网 100 μm Cell Filter	3Tests (3个) 10Tests (10个)	绿色	常温，有效期三年

备注：各成分请根据试剂管上标签所示温度进行保存。消化液解冻后4℃保存30天，建议初次使用试剂盒后将消化液按照说明书用量进行分装，冻存于-20℃冰箱内，使用时再次解冻，避免反复冻融。

四、注意事项

- 正式实验之前，推荐使用 1-2 只正常小鼠进行解剖模拟训练，以熟悉操作流程，提升组织分离速度。
- 整个分离操作过程中，建议将装组织的培养皿放在冰盘/冰盒上（2-8℃）保持低温，但注意不要使组织和液体因温度过低而结冰，以免冻伤组织，影响提取效果。
- 试剂配制或分装需严格遵循无菌操作规范。分装后立即用封口膜封口，即取即用，避免反复冻融或污染。
- 本试剂盒中的所有分离液在储存过程中可能会出现瓶口析出晶体颗粒物、溶液变浑浊的情况，属于正常现象，可放心使用。

五、操作流程

（一）实验前准备：

- 实验需自备试剂和耗材：无菌 EP 管架、0.25%胰蛋白酶消化液、解剖板（可用泡沫板替代）、冰盘/冰盒、PBS、手术器械（至少包含 3 把眼科剪、2 把直镊、1 把弯镊）、组织处理皿（玻璃皿、6 cm/10 cm 都可）、6 cm 培养皿、T25 瓶、以及若干个 15 mL/50 mL 离心管，如需扩大培养需自备完培、胰酶。
- 试剂解冻与复温：
 - 小鼠肝窦内皮细胞组织消化酶、小鼠肝窦内皮细胞培养基添加剂：4℃ 冰箱解冻，恢复至室温。
 - 小鼠肝窦内皮细胞专用清洗液、小鼠肝窦内皮细胞组织消化酶稀释液、小鼠肝窦内皮细胞专用分离液 A、小鼠肝窦内皮细胞专用分离液 B、小鼠肝窦内皮细胞专用分离液 C、小鼠肝窦内皮细胞基础培养基：恢复至室温。
 - 小鼠肝窦内皮细胞完全培养基配制：将 5 mL 小鼠肝窦内皮细胞培养基添加剂加入 50 mL 小鼠肝窦内皮细胞基础培养基，混匀后待用。
 - 小鼠肝窦内皮细胞组织消化工作液配置：将 0.5 mL 小鼠肝窦内皮细胞组织消化液加入 4.5 mL 小鼠



窦内皮细胞组织消化液稀释液，混匀后待用。

备注：小鼠肝窦内皮细胞完全培养基保存条件：2-8℃，有效期：3 个月。配制完全培养基时可根据使用量进行配制，剩余添加剂需按照比例进行分装后，置于-5~-20℃冰箱内保存，避免反复冻融。

（二）解剖操作：

1. 动物消毒及处死：使用过量戊巴比妥注射处死小鼠，于 75%医用酒精中浸泡灭菌 5 min，消毒完成后将动物转运至超净工作台内，进行后续操作。
2. 解剖取材步骤
 - (1) 准备工作：将剪刀器械按照使用顺序从左向右依次排列在两个已消毒的 EP 管架上方：眼科剪 1、直镊 1、眼科剪 2、直镊 2、眼科剪 3、弯镊 3。

备注：将眼科剪和镊子成对放置，这些工具的前端约三分之一部位悬空，以避免与 EP 管架接触造成污染。每次使用后将剪镊放回原有位置，并确保它们之间不相互触碰，防止交叉污染。
 - (2) 固定小鼠：在超净工作台内，使用针头仰卧固定实验鼠，准备进行取材操作。
 - (3) 取材操作：
 - ① 用直镊 1 固定夹住腹胸部皮肤，用眼科剪 1 沿腹中线纵向剪开腹胸部皮肤，用直镊 1 沿开口处夹起皮肤，眼科剪 1 向四肢方向横向剪开皮肤，用眼科剪 1 剪开并刮离皮肤和皮下组织黏连处，注意不要剪破腹膜，配合直镊 1 将皮肤剥离并拉向两侧，暴露腹壁浅肌层。
 - ② 用直镊 2 固定夹住腹膜，眼科剪 2 剪开腹膜，充分暴露肝脏组织。用直镊 2 固定肝脏组织，眼科剪 2 剪除肝脏周围结缔组织和血管，取出完整的肝脏组织，将组织放于玻璃培养皿内（将整个培养皿放在冰盘/冰盒上以保持低温环境），培养皿内预先加入适量小鼠肝窦内皮细胞专用清洗液需要浸没组织。

（三）组织处理及消化

1. 组织处理：
 - (1) 弯镊 3 夹住肝叶连接处，轻轻抖动肝组织，此时有血污流出，吸弃皿内液体，加入新的小鼠肝窦内皮细胞专用清洗液至完全浸没组织，漂洗组织 2-3 遍，使用眼科剪 2、弯镊 3 清理肝脏周围血污、胆管、血管，获得纯净组织，将组织转移至新玻璃培养皿内，将培养皿倾斜大概 45°左右使肝组织聚集在皿底部（可用弯镊 3 轻轻划落），从皿上部侧壁打入小鼠肝窦内皮细胞专用清洗液至刚好没过器皿底部组织为宜（全程将培养皿倾斜 45°左右）。
 - (2) 用眼科剪 3 将组织快速剪成 1 mm³ 碎块，剪至组织呈砂糖状（如图 1 所示），无大块组织为止，用巴氏吸管或者装有宽口吸头的移液枪吸取组织液转移至 50 mL 离心管内，加入 5 mL 小鼠肝窦内皮细胞专用清洗液清洗肝组织培养皿后转移至同一离心管内，经 300 g，离心 1 min，丢弃上清，保留组织沉淀。



2. 组织消化:

- (1) 向下一步 50mL 离心管组织沉淀内加入 5 mL 小鼠肝窦内皮细胞消化工作液, 吹打混匀后将离心管管口缠上封口膜, 横管平放在 4℃消化 16 h (消化时间请勿超过 16 h, 过度消化后对细胞活率会产生明显影响)。
- (2) 消化完成后取出离心管, 离心管转移至 37℃水浴摇床内 150 rpm 消化 15 min。

3. 细胞分离:

- (1) 将 100 μm 细胞滤网、70 μm 细胞滤网分别放置在两个在 50 mL 离心管上, 使用 1-2 mL 小鼠肝窦内皮细胞专用清洗液润洗滤网。
- (2) 用 5 mL 移液枪或巴氏吸管小心吹打下一步 50 mL 离心管中消化的组织悬液, 依次经 100 μm 细胞滤网、70 μm 细胞滤网过滤完成后, 可用干净枪头向滤网上方缓慢加入 3-5 mL 小鼠肝窦内皮细胞专用清洗液来收集滤网上的组织消化悬液, 收集滤液于 50 mL 离心管内, 收集完成后细胞滤液于 400 g 离心 10 min, 丢弃上清, 保留沉淀。

注: 过滤标准-悬液容易通过筛网, 无大量胶状物质。若在此步骤中遇到悬液过滤缓慢或无法过滤的情况, 可能是由于细胞筛与离心管管口贴合太紧, 此时可以尝试将细胞筛稍微倾斜放置在 50 mL 离心管上, 以改善这一现象。

- (3) 用 6 mL 小鼠肝窦内皮细胞专用分离液 A 重悬上一步中 50mL 离心管中细胞沉淀, 于 900 g 离心 15 min, 吸弃上清 (上清为肝星状细胞, 少量肝窦内皮、肝枯否、肝实质细胞等), 保留沉淀。
- (4) 用 6 mL 小鼠肝窦内皮细胞专用分离液 B 重悬上一步骤中 50mL 离心管得到的沉淀, 取一支新的无菌 15 mL 离心管, 加入 3 mL 小鼠肝窦内皮细胞专用分离液 C。使用 1 mL 移液枪吸取 50mL 离心管中细胞悬液, 倾斜 15 mL 离心管, 枪头抵住 15 mL 离心管管壁, 轻柔打出细胞悬液使其沿管壁缓慢流入到小鼠肝窦内皮细胞专用分离液 C 上方液面 (如图 2 所示), 令二者形成液面分层 (如图 3 所示)。

注: 若不能确保能够使两种分离液产生分层, 可用 200 μL 枪头吸取重悬后的 50mL 离心管细胞悬液按上述操作沿管壁缓慢先打入 5-6 枪左右, 待看见明显的液面分层后, 再使用 1 mL 枪头缓慢加入剩余的悬液, 液面分层可在灯光下观察, 能看见两种分离液之间有明显的分界线。细胞悬液加入到小鼠肝窦内皮细胞专用分离液 C 时动作轻柔缓慢, 确保悬液在小鼠肝窦内皮细胞专用分离液 C 上方, 避免打入到液面中, 影响到后续分层细胞量减少。

- (5) 分层完毕后, 将 15mL 离心管经离心机: 离心力 900 g, 离心 15 min (设置升速为 1、降速为 0); 离心后可见液体分 5 层, 从上到下依次为: 大约 2-5 mm 厚的肝星状细胞层, 大约 6 mL 分离液 B 层, 大约 2-3 mm 厚的肝窦内皮、肝枯否混合细胞层 (以下简称白膜层), 大约 3 mL 分离液 C 层, 大约 2-5 mm 厚的红细胞沉淀层 (如图 4 所示)。
- (6) 吸弃最上层细胞层, 使用 1 mL 移液枪, 枪头伸到白膜层上方, 小心吸取第三层的白膜层的细胞于新的无菌 15 mL 离心管中, 加入 5 mL 小鼠肝窦内皮细胞专用清洗液重悬细胞悬液, 经 400 g 离心 5 min, 丢弃上清, 保留沉淀。



(四) 细胞培养及传代

1. 细胞接种：用 5 mL 小鼠肝窦内皮细胞完全培养基重悬沉淀，接种到新的 6 cm 培养皿 A 中，于 37℃，5% CO₂ 培养箱中培养 20 min 后，吸取培养上清液 A，转移至新的培养皿 B 中，在原培养皿 A 内添加 5 mL 新鲜小鼠肝窦内皮细胞完全培养基继续培养。
2. 培养皿 B 中上清液 A 于 37℃，5% CO₂ 培养 15 min 后，吸出血内的培养上清液 B，转移到新 T25 培养瓶中，原培养皿 B 加入 5 mL 新鲜小鼠肝窦内皮细胞完全培养基继续培养。

注：此步为差速分离不同细胞贴壁，A 皿内最后留下主要为贴壁性较强的肝枯否细胞（较为分散、长梭形的巨噬细胞样），B 皿内最后留下主要为肝枯否细胞以及少量的肝窦内皮细胞，留观此两皿细胞，有助于后续可能遇到的问题排查。T25 培养瓶为纯度较高的肝窦内皮细胞。

3. 细胞换液：T25 培养瓶中上清液 B 于 37℃，5% CO₂ 培养 24 h 后换液，之后每隔 2-3 天进行一次换液。
4. 细胞传代：小鼠肝窦内皮细胞最多传代一次，接种大约 3 天左右细胞汇合度达到 80-90%，细胞呈聚拢趋势的梭形的内皮样，即可进行传代。吸弃原上清液，加入 2-3 mL PBS 润洗细胞，弃去 PBS，加入 1 mL 0.25% 胰蛋白酶消化液，轻轻晃动培养瓶，确保消化液浸润瓶中所有细胞，吸弃胰蛋白酶，将培养瓶放入 37℃ 培养箱内消化 1-3 min。待大部分细胞收缩变圆后，加入 5 mL 小鼠肝窦内皮细胞完全培养基终止消化，轻轻吹匀、分散细胞，按传代比例或实验需求，将细胞接种到新的无菌器皿中，置于 37℃、5% CO₂、饱和湿度的细胞培养箱中静置培养。

六、常见问题

表2. 小鼠肝窦内皮分离常见问题、原因及解决方法

常见问题	可能原因	解决方法
在流程（三）步骤2的（1）后见大量组织块沉积在管底。	组织消化不充分（组织取材量过多、消化时离心管没有平放等）	组织剪至呈砂糖状；离心管靠壁平放；消化液体积大于等于组织块的3倍。
在流程（三）步骤3的（2）中复温消化后不能完全吹散组织，仍有块状组织。	消化不充分（消化酶保存条件不当酶失活；组织消化不充分）	重新开封一瓶消化酶按照要求保存；在不破坏大部分细胞活性的情况下可以考虑研磨处理组织。
在流程（三）步骤6中未见分离体系离心后呈明显5层。	分层操作时两种液体融合、少量分层。	严格按照流程（三）步骤5中的离心升速降速要求设置离心。
在流程（三）步骤6中未见分离体系经离心后在目标层有细胞白膜层。	消化过度导致细胞死亡。	控制4℃消化时间不超过16 h。
细胞得量少。	组织取材量少、差速贴壁时间不当。	严格按照说明书要求的鼠龄和小鼠数量（获取肝组织太少可增加提取小鼠数量）；检查细胞是否滞留于前两步差速贴壁的皿内，根据结果调整差速贴壁时间。



续表2. 小鼠肝窦内皮分离常见问题、原因及解决方法

常见问题	可能原因	解决方法
细胞纯度低、混有杂细胞。	细胞液中混有肝枯否细胞。	使用差速消化法纯化肝窦内皮细胞（枯否细胞贴壁性强，难以消化，可用胰酶消化1-2 min，将消化得到的肝窦内皮细胞转移）。

七、实验参考图片

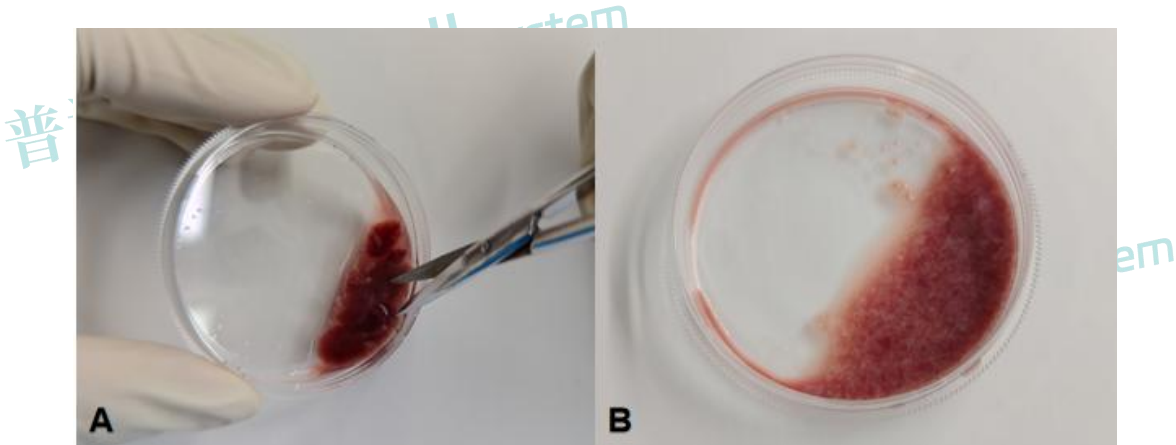


图 1. 肝脏组织离体后处理
A: 肝组织剪碎操作示范；B: 肝脏剪碎后状态参考



图 2. 细胞悬液与分离液分层操作示范



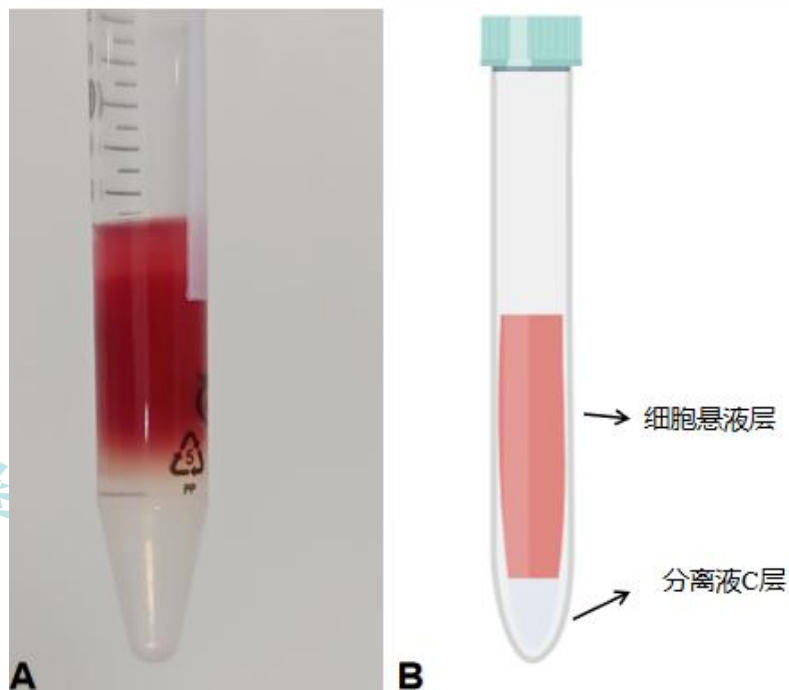


图 3.液面分层参考图

A: 细胞悬液与分离液C分层后实拍图; B:细胞悬液与分离液C分层后示意图

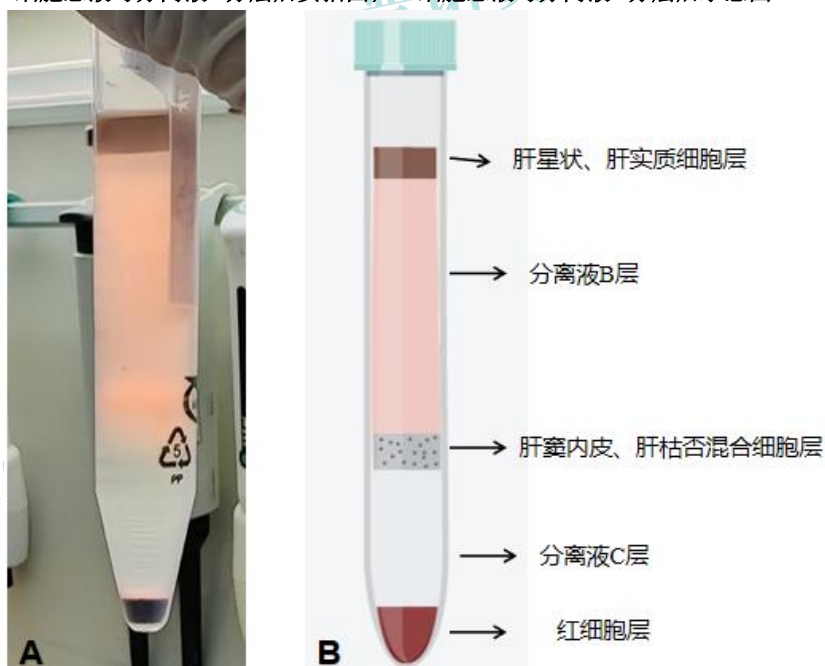


图 4.细胞悬液经分离液离心后参考图

A: 细胞悬液经分离液离心后分层实拍图; B:细胞悬液经分离液离心后分层示意图

(仅作参考, 细胞层厚度、分离液 B 层颜色深浅会根据实验条件不同)

